

THESE

présentée à l'Université des Sciences & Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité: Physiologie & Biologie des Organismes & des Populations

Cinétique de la nutrition minérale et métabolisme du carbone et de l'azote dans des suspensions cellulaires hétérotrophes & photomixotrophes.

Aspects physiologiques & biochimiques
chez Abrus precatorius L. (Leguminosae)

par:

Alain RIVAL

Soutenue le 19 Mai 1989 devant le Jury composé de:

MM. Nicole PARIS-PIREYRE	Président
Hervé CHRESTIN	Rapporteur
Aimé NATO	Rapporteur
Robert JONARD	Examineur
Jean d'AUZAC	Examineur
Jean-Claude BACCOU	Examineur

TDM 60

ORSTOM

Editions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

Collection :

Travaux et documents microédités
PARIS 1989

ISBN 2-7099-0973-1

© ORSTOM

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, « que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal ».

F6

Pour Renée, merci encore...

Pour Manuelle,

Pour Jeanne ... ou Baptiste!

Grise est la Théorie, mais vert est l'arbre de la Vie.
Goethe.

AVANT-PROPOS

La présente étude a été réalisée, sous la Direction Scientifique du Dr Hervé CHRESTIN, au Laboratoire de Physiologie & Biotechnologie Végétales de l'ORSTOM (Institut Français de la Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération), à ABIDJAN (Centre d'Adiopodoumé) en Côte d'Ivoire.

La partie expérimentale de travail a été effectuée durant trente mois de séjour, de Mai 1986 à Août 1988, durant mon incorporation en tant que Volontaire du Service National Actif, puis comme Allocataire de Recherches de l'ORSTOM pour la seule partie de mes recherches réalisée hors de Métropole.

Je remercie vivement les dirigeants et les instances scientifiques de l'ORSTOM qui m'ont donné les moyens de réaliser Outre Mer cette partie de mes recherches : J.M.WACKERMAN & P. MONTSARRAT à Paris et J. LAUNAY, Représentant de l'ORSTOM en Côte d'Ivoire.

Bernard MARIN, responsable à l'ORSTOM de l'Unité de Recherche 603, nous a fait bénéficier à tout moment de ses talents d'administrateur de la recherche, je me dois de lui adresser mes plus sincères remerciements.

La qualité de son accueil au sein de l'U.F. de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier a grandement facilité la rédaction du présent mémoire.

Cette étude a bénéficié de l'agrément du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur de Côte d'Ivoire.

Les molécules marquées par radioactivité nous ont été fournies gracieusement par le Commissariat à l'Energie Atomique. J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble de ces instances.

L'initiation de ma formation à la recherche, au sein du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'U.S.T.L. de Montpellier dirigé par Mme le Professeur N. PARIS PYREIRE, a été rendue possible, de 1983 à 1985, par un financement du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Cette étude s'intègre dans le programme défini par l'ORSTOM au sein de son Département *Milieu et Activités Agricoles*, intitulé : **Production de Métabolites Cellulaires**, et mené conjointement en Côte d'Ivoire (Centre d'Adiopodoumé) et en France (Centre de Montpellier).

Une partie des résultats présentés dans ce mémoire a fait l'objet de présentations de posters au Colloque International : 8th International Biotechnology Symposium. (Société Française de Microbiologie). Paris. 17-22 Juillet 1988:

RIVAL A., I. HARDY-CLARIS, H. CHRESTIN, P.TROUSLOT & B. MARIN (1988) : Characterization of a cell suspension culture of *Abrus precatorius* L. (Leguminosae) : I. Mineral nutrition and regulation of nitrogen metabolism. Abstract Book; p:117. Poster n° 107.

I. HARDY-CLARIS, RIVAL A., T. HARDY, H. CHRESTIN, P.TROUSLOT & B. MARIN (1988) : Characterization of a cell suspension culture of *Abrus precatorius* L. (Leguminosae) : II. Establishment, Energetics and carbon metabolism. Abstract Book; p:117. Poster n° 105.

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Mme le Professeur Nicole PARIS d'avoir bien voulu accepter de présider ce Jury.

J'ai eu un grand plaisir à effectuer une importante partie de ma formation de chercheur au sein de son Laboratoire. Ses conseils éclairés, la grande qualité de son écoute, m'ont été précieux tout au long de mon travail.

Mr le Professeur J. d'AUZAC est à l'origine de mon séjour en Côte d'Ivoire. Outre ses remarquables qualités d'enseignant, je lui dois d'avoir découvert un Institut de Recherche, une équipe dynamique,... et un continent passionnant!

Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mr le Professeur JONARD m'a accueilli dans son Laboratoire dès mes premières années de formation à la recherche. Sa grande culture scientifique dans le domaine des biotechnologies végétales, ses avis éclairés, son constant respect de mes initiatives personnelles, ont été un appui constant.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Hervé CHRESTIN a encadré mes recherches à Abidjan et a bien voulu accepter les fonctions de Rapporteur de Thèse. Je tiens à le remercier pour l'ambiance soigneusement dosée de travail passionné et de chaleureuse amitié qu'il a su maintenir au Laboratoire de Physiologie & Biotechnologies Végétales de l'ORSTOM à Adiopodoumé.

Aimé NATO a bien voulu participer à ce Jury de Thèse en tant que Rapporteur; qu'il trouve ici l'expression de tous mes remerciements.

Au cours de mes différents séjours au Laboratoire de Structure et Métabolisme des Plantes à l'Université de PARIS XI, j'ai pu m'initier aux techniques d'immunoenzymologie, en bénéficiant de sa grande compétence et de son infatigable (et contagieux!) enthousiasme.

Cela a-t-il un sens de remercier Jean Claude BACCOU d'être présent à ce Jury de Thèse? Sa disponibilité permanente, la chaleur de ses encouragements, sa complète confiance ne m'ont jamais fait défaut tout au long de ma formation de chercheur. Au cours de ces dernières années, il est devenu, avec Yves SAUVAIRE, bien plus qu'un directeur de recherche, un véritable ami. C'est à ce double titre que sa présence dans ce jury m'est très chère.

La rédaction de ce mémoire a été grandement facilitée par l'accueil que m'ont réservé M. RAIMBAULT et B. MARIN au sein de l'Unité Fonctionnelle de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier.

Je tiens à les remercier chaleureusement pour les importants moyens matériels qu'ils ont mis à ma disposition.

Monsieur le Professeur BOURDU m'a permis de mener une partie de mes recherches dans le Laboratoire de Structure & Métabolisme des Plantes qu'il dirige à Orsay. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Danièle LAVERGNE & Jackson HOARAU Enseignants-chercheurs au LSMP Orsay m'ont offert leur entière disponibilité, et m'ont fait partager leur grande expérience tout au long de mes séjours à l'UPS. Je tiens à leur exprimer ici toute ma sympathie, et souhaite que ces stages soient le début d'une fructueuse collaboration.

Je remercie Bertrand HIREL, chargé de Recherche au CNRS, pour ses conseils judicieux concernant la Glutamine Synthétase, et mon initiation à quelques aspects de la Biologie Moléculaire.

Mr GRIL , du Service de Microscopie Electronique de l'USTL, m'a permis , avec beaucoup d'amabilité, de bénéficier de ses récentes installations en matière d' Analyse d'Images; qu'il soit ici chaleureusement remercié pour sa compétence et sa disponibilité.

Comment oublier ceux avec qui s'est déroulé trop vite ce séjour à Abidjan, compagnons de Laboratoire, et d'ailleurs ...?:

Claudine NEF, Nadine LAMBERT, Yvan FRANCEY, Jean LORQUIN, et Frank TARDIEU ... Nos chemins , c'est certain, se croiseront à nouveau...

Isabelle et Thierry HARDY ont initié au sein du Laboratoire le programme Abrus. Je dois en grande partie à la grande valeur de leur travail d'avoir pu disposer d'un matériel végétal de qualité.

C'est avec un grand plaisir que je remercie l'ensemble du personnel des Services Communs du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé pour leur constante disponibilité et leur gentillesse.

Parmi eux, Alain ROCHETEAU (Service Froid-Electricité) et Norbert SILVERA (Service Radio Isotopes) ont constamment collaboré à la mise en place et au suivi technique de ce travail .

J'ai eu un grand plaisir à travailler avec Michel NIAMIEN N'GORAN dont j'ai pu apprécier la qualité de l'assistance technique.

Je tiens à remercier tout particulièrement Prosper ZADI -KOUBI & Charles TOLLAH, sans qui l'entretien de notre vitrothèque n'aurait pas été possible.

Merci à tous les membres de notre équipe technique à Adiopodoumé, pour la connaissance profonde et l'amour qu'ils ont de leur pays, et leur joie de les faire partager avec qui sait les entendre.

Merci encore à Fassoko DOUMBIA, Kara KOUILLI, pour leur aide discrète, efficace, et indispensable.

Merci enfin à l'Afrique et aux africain(e)s, pour leurs leçons quotidiennes d'humilité, de courage et de bonne humeur, même si ce continent m'oubliera bien plus vite que je ne le ferai.

RESUME

Dans le but de cerner in vitro l'impact de la photosynthèse sur les voies métaboliques essentielles, un souchier de lignées cellulaires photomixotrophes et photohétérotrophes a été établi, sous forme de cals et de suspensions cellulaires, pour une plante médicinale tropicale: *Abrus precatorius* L.(Leguminosae).

La consommation, en cours de culture, des macroéléments majeurs du milieu (nitrates, ammonium, phosphore inorganique, sulfates) a été mesurée. Cette étude a permis de mettre en évidence des différences importantes entre les besoins nutritionnels pour chaque élément.

De plus, une caractérisation partielle des deux enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote minéral: Nitrate Réductase (NR) et Glutamine Synthétase (GS) a été réalisée.

Afin de mieux connaître les phénomènes biochimiques liés à la photomixotrophie, l'activité de deux carboxylases (Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase -*Rubisco*- & PhosphoEnol Pyruvate Carboxylase -*PEPc*-) a été mesurée sur les suspensions cellulaires.

Nous avons suivi l'activité de ces quatre systèmes enzymatiques (NR,GS *Rubisco* & *PEPc*) au cours de cultures conduites dans différentes conditions (hétéro/mixotrophie) à l'aide de deux systèmes de culture (fioles d'Erlenmeyer et bioréacteur expérimental de 2 litres).

Cette étude est complétée par une caractérisation immunologique de ces enzymes, permettant de dégager quelques données concernant leur biosynthèse et leur régulation.

Mots-clés:

Abrus precatorius L.
Cultures cellulaires
Photomixotrophie
Nutrition azotée
Nitrate Réductase
Glutamine Synthétase
Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase
PhosphoEnolPyruvate Carboxylase

Kinetic patterns of mineral nutrition & metabolism of carbon & nitrogen in heterotrophic and photomixotrophic cell suspensions.

Physiological & Biochemical aspects in *Abrus precatorius* (Leguminosae)

ABSTRACT

In order to describe the part of photoautotrophy upon essential metabolic pathways, a collection of cell lines (photoheterotrophic & photomixotrophic) is established, as calluses and cell suspension cultures, for a tropical medicinal plant : *Abrus precatorius* L. (Leguminosae).

During the culture, the uptake of major macroelements from the medium (nitrates, ammonia, inorganic phosphorus and sulphates) is evaluated. This study permitted to point out several important differences in the nutritional requirements of the cells, for each mineral nutriment.

Furthermore, a partial characterization of two enzymes involved in the assimilation of mineral nitrogen : Nitrate Reductase (NR) & Glutamine Synthetase (GS) is performed .

In the aim of understanding the biochemical phenomenons related to mixotrophy, the activity of two carboxylating enzymes : Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase (Rubisco) & Phospho Enolpyruvate Carboxylase (PEPc) is measured in cell suspensions.

We studied the activity of four enzymatic systems (NR, GS, PEPc & Rubisco) established in different conditions (hetero- or mixotrophy) in two distincts culture apparatuses: erlenmeyer flasks or 2 liters-experimental bioreactor.

This study is finally perfected by an immunological characterization of two of these enzymes (NR & Rubisco), wich allowed to obtain several informations about their biosynthesis and regulation.

Key words:

Abrus precatorius L.
Cell cultures
Photomixotrophy
Nitrogen nutrition
Nitrate Reductase
Glutamine Synthetase
Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase
PhosphoEnolPyruvate Carboxylase

ABREVIATIONS

AcMc	Anticorps monoclonaux
ADP	Adenosine diphosphate
AGS	Activité Glutamine Synthétase
AMP	Adenosine monophosphate
5'AMP-Sépharose	Adenosine 5' monophosphate-Sépharose 4B
ANR	Activité Nitrate réductase
ARN	Acides Ribonucléiques
AOA	Acide Oxalo Acétique
APG	Acide Phospho Glycérique
ATP	Adenosine triphosphate
B ₅	Milieu de GAMBORG <i>et al.</i> (1968) modifié
BBP	Bleu de bromophénol
BSA	Bovine Serum Albumine
cps	coups par seconde
Da	Masse moléculaire apparente exprimée en Dalton
DEAE-Cellulose	Diethylaminoéthyl-Cellulose
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide (éthylène dinitrilo)-tétraacétique
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EG	Ethylène glycol
EGTA	Ethylèneglycol-bis-(β-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraacetate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Essay
FAD	Flavine Adenine Dinucléotide
γGH	γ-Glutaryl Hydroxamate
FMN	Flavine mononucléotide (Riboflavine 5'-phosphate)
GDH	Glutamate Déshydrogénase : E.C. 1.4.1.2
GOGAT	Glutamate (amide)-2-oxoglutarate aminotransférase
GOT	Glutamate Oxaloacetate Transaminase
GS	Glutamine Synthétase
HEPES	Acide N-2-Hydroxyéthylpiperazine-N'-2-ethane sulfonique
IEF	Iso Electro Focusing
IgG	Immunoglobuline G
kD	Masse moléculaire apparente exprimée en kilo Dalton
Km	Constante d'affinité de Michaelis-Menten
K-Phosphate	Tampon KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
LSMP	Laboratoire de Structure & Métabolisme des Plantes (PARIS XI Orsay)
LSU	grande sous-unité (Rubisco)
MDH	Malate déshydrogénase. E.C. 1.1.1.37
mCi	milli Curie
MES	Acide 2-(N-Morpholino) ethane sulfonique
M.F.	Matière fraîche
MOPS	Acide 3-(N-Morpholino) ethane sulfonique
MS	Milieu de MURASHIGE & SKOOG (1962)
NAD(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide. forme oxydée (réduite)
NH ₂ OH	Hydroxylamine
N.R.	Nitrate réductase
OAA	Oxaloacétate
PAC	Phosphatases acides
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEP Case	Phosphoénolpyruvate carboxylase E.C. 4.1.1.38

PGA	Acide phosphoglycérique
pH	Potentiel des ions hydroxonium
PMSF	Phenyl-methyl sulfonyl fluorure
POX	Peroxydases
PPO	2,5 diphényloxazol
PVP	Polyvinyl-Pyrrolidone
r.p.m.	révolutions par minutes
Rubisco	Ribulose biphosphate carboxylase E.C. 4.1.1.39
RubP	Ribulose biphosphate
RubP Case	Ribulose biphosphate carboxylase E.C. 4.1.1.39
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSU	petite sous-unité (Rubisco)
TCA	Acide trichloracétique
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
Vmax	Vitesse initiale maximale (cinétique enzymatique)
v./v.	Volume/Volume
v.v.h	Volume d'air par volume de culture et par heure
w./v.	Poids/Volume

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
Le programme "Valorisation biotechnologique des plantes médicinales tropicales" à l'ORSTOM:	22
<u>Abrus precatorius</u> L.: une plante-modèle:	22
Etudes physiologiques et biochimiques:	23
 DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	 24
A) LES CULTURES CELLULAIRES VEGETALES ET LA PRODUCTION <i>IN VITRO</i> DE METABOLITES SECONDAIRES:	25
1) Spécificité de la cellule végétale:	25
a) La vitesse de croissance:	25
b) La stabilité des lignées:	26
c) La fragilité de la structure cellulaire:	28
2) Les potentialités biosynthétiques:	28
3) Technologie des bioréacteurs et potentialités industrielles:	29
B) LES CULTURES DE CELLULES VEGETALES AUTOTROPHES	33
1) Intérêt comme modèle physiologique	35
2) Photoautotrophie et métabolisme secondaire	35
C) LA NUTRITION MINERALE DES CULTURES CELLULAIRES VEGETALES	37
1) La nutrition minérale des cultures <i>in vitro</i>	37
2) Nutrition minérale et métabolisme secondaire	40
3) Cas de la nutrition azotée	41
D) ETUDES ENZYMOLOGIQUES	43
<i>Pourquoi des études enzymologiques?</i>	43
1) La Nitrate Réductase:	45
a) Fonction & Structure:	45
b) Propriétés:	46
- Spécificité vis-à-vis des donneurs d'électrons	47
- Constantes cinétiques	48
- Labilité	49
c) Régulation de l'activité	50
- régulation par le nitrate	50
- régulation par l'ammonium	52
- divers facteurs externes de régulation	52
- régulation par la lumière	52
d) Assimilation des nitrates et photosynthèse:	52
e) Les cultures de cellules végétales : un modèle d'étude de grand intérêt	53
2) La Glutamine Synthétase:	54
a) Fonction & Structure	54

b) Régulation	58
c) La GS dans les cultures cellulaires <i>in vitro</i>	59
3) La Ribulose 1-5 bisphosphate Carboxylase: Rubisco	60
a) Fonction & Structure	60
b) Propriétés	60
- Activation par le CO ₂ et les cations divallents	60
- Régulation par les métabolites chloroplastiques	61
- Régulation par une protéine: la Rubisco activase	61
c) Rubisco et cultures cellulaires végétales <i>in vitro</i>	61
4) La Phosphoénol Pyruvate Carboxylase: PEP Case	62
a) Fonction & Structure	62
b) Propriétés	62
c) La PEPc dans les cultures cellulaires végétales <i>in vitro</i> :	63
 E) APPORTS DE L'IMMUNOENZYMOLOGIE EN PHYSIOLOGIE CELLULAIRE VEGETALE:	64
1) Les anticorps: Structure & propriétés fondamentales:	66
a) Les anticorps polyclonaux	66
b) Les anticorps monoclonaux	68
2) Utilisations des antisérums en physiologie cellulaire végétale	69
a) Purification de systèmes enzymatiques végétaux	69
b) Caractérisation qualitative:	69
- Immunoprécipitation	69
- Immunodiffusion en gels: OUCHTERLONY	70
- Immunoempreintes	70
c) Déterminations quantitatives spécifiques	71
- Immunoélectrophorèse (immunorockets)	71
- Tests ELISA	71
- Tests RIA	71
d) Immunolocalisation subcellulaire	71
 F) CONCLUSION GENERALE	72
 MATERIEL & METHODES	73
A) LE MATERIEL BIOLOGIQUE	75
1) Description botanique	75
2) Données ethnobotaniques-utilisations traditionnelles	75
3) La glycyrrhizine	76
a) Structure et propriétés:	76
b) Problèmes de détection chez <i>Abrus precatorius</i>	77
4) Origine du matériel étudié	77
B) LA CULTURE IN VITRO	78
1) Etablissement des lignées statiques:	78
a) Désinfection du matériel végétal	78
b) Paramètres physiques	78

c) Ensemencements primitifs	80
d) Entretien des lignées statiques	80
2) Passage en suspension et cultures en fioles d'Erlenmeyer	81
3) Culture en bioréacteurs:	82
a) Description du matériel	82
b) Techniques de prélèvement	85
c) Mise en oeuvre d'une culture en bioréacteur	85
C) METHODES ANALYTIQUES	85
1) Estimations de la biomasse	85
2) Dosage des sucres	87
3) Dosage des principaux macroéléments:	88
a) Dosage des ions ammonium	90
b) Dosage des ions nitrates	90
c) Dosage du Phosphore inorganique	93
d) Dosage des ions sulfates	93
e) dosages des cations	93
4) Dosage des chlorophylles totales	93
a) Choix d'une technique d'extraction	93
b) Influence du nombre de cycles broyage/centrifugation	95
c) Calcul des concentrations	98
5) Dosage des protéines solubles	98
6) Mesure des échanges gazeux	98
D) METHODES D'ETUDES ENZYMOLOGIQUES	98
1) Extraction et prépurification des protéines	98
a) Extraction des protéines solubles	101
b) Prépurification des extraits bruts	101
1) Nitrate réductase	101
2) Carboxylases	101
2) Mesure des activités NADH- Nitrate Réductase et BBP-NR:	101
a) Dosage colorimétrique de l'activité NADH-NR	102
b) Dosage colorimétrique de l'activité BBP-NR	103
3) Dosage colorimétrique de l'activité Glutamine Synthétase	103
4) Mesure d'activité des carboxylases Rubisco & PEP Case.	103
a) Dosage radio chimique de l'activité Rubisco	105
b) Dosage radio chimique de l'activité PEPc	105
5) Techniques d'electrophorèse:	106
a) Electrophorèse sur gel d'amidon	106
b) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	107
1) Préparation des gels de polyacrylamide	107
2) Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	107
c) révélations spécifiques d'activités enzymatiques	109
6) Marquage à la ³⁵ S Méthionine des protéines solubles	109
a) Incorporation de la ³⁵ S Méthionine	109
b) Electrophorèse SDS-PAGE et autoradiographie des protéines marquées	110
E) METHODES IMMUNOENZYMOLOGIQUES	110
1) Obtention d'Anticorps polyclonaux:	110
a) Purification des systèmes enzymatiques	110

b) Procédé d'immunisation d'un lapin	111
c) Préparation et purification du sérum	113
2) Tests d'immunodiffusion	113
a) Test d'OUCHTERLONY	113
1) Principe	113
2) Préparation des plaques d'OUCHTERLONY	113
3) Incubation	114
4) Révélation des arcs d'immunoprécipitation	114
b) Test d'immunodiffusion radiale: méthode de MANCINI	116
1) Principe	116
2) Préparation des plaques de MANCINI	116
3) Immunoélectrophorèse: méthode de LAURELL	116
a) Principe	117
b) Préparation des plaques	117
c) Electrophorèse	117
4) Immunotitration de l'activité enzymatique ou immuno-inactivation	119
5) Immunoempreintes ou immunoblotting	119
a) Principe	119
b) Electrotransfert	119
c) Révélation immunochimique spécifique	121
6) Techniques d'immunosélection : chromatographie d'immunoaffinité	123
a) Principe	123
b) Protocole expérimental	123
F) MICROSCOPIE PHOTONIQUE & ELECTRONIQUE	125
1) Microscopie optique	125
2) Microscopie électronique	125
3) Analyse d'images	126
 RESULTATS & DISCUSSIONS	 129
A) ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES DE CULTURE SUR DES CALS DE PROLIFERATION D'ABRUS PRECATORIUS CULTIVES EN PHOTOMIXOTROPHIE :	130
1) Evolution de la biomasse:	130
2) Evolution de la teneur en chlorophylles totales:	130
3) Mise en évidence d'une photosynthèse nette :	133
B) ETUDE CINETIQUE DE DIFFERENTS PARAMETRES DE CULTURE SUR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES HETERO & PHOTOMIXOTROPHES CULTIVEES EN FIOLES OU EN BIOREACTEUR AERE :	135
1) Evolution de la biomasse:	135
2) Evolution des échanges gazeux :	138
a) Evolution de la respiration :	138
b) Evolution des échanges d'oxygène à la lumière :	140
3) Evolution de la teneur en chlorophylles : (suspensions photomixotrophes)	140
4) Nutrition carbonée :	142
a) Evolution des glucides exocellulaires :	142
b) Evolution des glucides intracellulaires :	143
5) Evolution des protéines solubles :	145

6) Evolution du pH du milieu :	145
7) Discussion : caractéristiques du métabolisme primaire :	148
C) CINETIQUE DE LA NUTRITION MINERALE DANS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES MIXO - & HETEROTROPHES CULTIVEES EN ERLLENMEYER ET EN BIOREACTEUR AERE :	150
1) Cinétique de consommation des ions nitrate (NO_3^-):	150
a) Résultats :	150
b) Evolution des concentrations intracellulaires :	151
c) Comparaison et discussion:	151
2) Cinétique de consommation des ions ammonium (NH_4^+):	152
a) Résultats :	152
b) Evolution des concentrations intracellulaires:	152
c) Evolution du rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$:	156
d) Comparaison et discussion:	156
3) Cinétique de consommation des ions sulfate (SO_4^{2-}):	156
a) Résultats:	158
b) Comparaison et discussion:	159
4) Cinétique de consommation du phosphore inorganique (Pi):	159
a) Résultats:	160
b) Evolution des concentrations intracellulaires :	160
c) Discussion :	162
5) Cas des cations divallents: Calcium, potassium, magnesium:	164
6) Discussion générale et relation avec divers paramètres physiologiques:	168
7) Conclusion:	168
D) CARACTERISATION ET EVOLUTION DES ACTIVITES DE QUATRE ENZYMES-CLEFS : NITRATE REDUCTASE, GLUTAMINE SYNTHETASE, RUBISCO & PEP CARBOXYLASE	170
1) la Nitrate Réductase:	170
a) Caractérisation partielle de l'enzyme :	170
1) Effet du pH:	170
2) Effet de la nature du tampon d'extraction:	172
3) Spécificité pour le donneur d'électrons:	172
4) Conditions de linéarité de la mesure d'activité :	172
5) Effet des protéines exogènes:	172
6) Mesure des constantes de Michaelis-Menten pour nitrate et NADH	176
7) Effet des cations divallents: Calcium & Magnesium :	178
8) Effet des complexants: EGTA & EDTA:	178
9) Effet de l'ammonium:	180
10) Effet des nucléotides: FMN, NAD, FAD et du Molybdène:	180
11) Effet des composés antioxydants à thiols : (DTT & cystéine)	182
b) Evolution de l'activité N.R. dans des cultures hétéro et mixotrophes en fioles et en bioréacteur :	182
1) Evolution de l'activité nitrate réductase:	182
2) Relations avec la nutrition azotée:	184
3) Relations avec le pouvoir réducteur de la cellule:	188
4) Influence de l'aération des cultures	188
c) Propriétés immunoenzymologiques:	190

1) Immunotitration des activités BBP-NR & NADH-NR sur des feuilles de <i>Spinacia oleracea</i> :	190
2) Immunotitration des activités BBP-NR & NADH-NR sur <i>Abrus precatorius</i> :	192
2) La Glutamine Synthétase:	194
a) caractérisation partielle de l'enzyme:	194
1) pH optimum:	194
2) Conditions de linéarité de la mesure d'activité:	197
3) Mesure des constantes de Michaelis-Menten pour le glutamate, l'hydroxylamine, et l'ATP:	197
b) Evolution de l'activité glutamine synthétase dans des cultures cellulaires hétéro et mixotrophes cultivées en fioles d'ermeneyer:	199
3) Les carboxylases : Rubisco & PEP Case:	202
a) Etude de l'évolution des activités carboxylases dans des cultures hétéro- et mixotrophes en fioles ou en bioréacteur:	202
1) Evolution de l'activité PEP Carboxylase:	202
2) Evolution de l'activité Rubisco:	203
b) Caractérisation immunoenzymologique:	207
1)Extraction de la Rubisco	207
2) Immunoempreintes	207
3) Tests d'immunodiffusion	208
4) Immunoélectrophorèses	216
5) Immunotitration	218
6) Conclusions	218
E) QUELQUES ASPECTS DE LA REGULATION DE DIVERS SYSTEMES ENZYMATIQUES DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES D'ABRUS PRECATORIUS.	221
1) Mise en évidence de phénomènes de néosynthèses protéiques:	221
a) Problématique:	221
b) Résultats & discussion:	221
2) Etude des isoformes de divers systèmes enzymatiques:	225
a) Problématique:	225
b) Résultats & discussion:	227
F) OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES:	231
1) Microscopie optique:	231
2) Microscopie électronique:	231
3) Conclusions :	232
CONCLUSION GENERALE	233
BIBLIOGRAPHIE	238

ANNEXES	263
* Annexe A : composition des solutions-tampon	264
* Annexe B : composition des milieux & réactifs	266
* Annexe C : protocoles de dosages minéraux	268
* Annexe D : Evolution des nucléotides adényliques et pyridiniques (HARDY-CLARIS - 1988)	273
* Addendum : Extraction et dosage de la glycyrrhizine	276
* Planches photographiques	285

INTRODUCTION

"L'un des principaux objectifs sociaux des gouvernements et de la communauté mondiale au cours des prochaines décennies doit être de donner à tous les peuples du monde, d'ici l'an 2000, un niveau de santé qui leur permette de mener une vie socialement et économiquement productive."

Déclaration finale Conférence de l'ONU . Alma Ata (1978).

Afin d'atteindre cet objectif avec la participation des communautés rurales, les soins de santé primaires constituent, dans tous les Pays En Développement, l'une des stratégies les plus réalistes et les plus efficaces. Dans ce cadre, l'intérêt que représente la pharmacopée traditionnelle en tant que ressource locale ne fait aujourd'hui plus aucun doute.

Outre une relative indépendance sanitaire, la valorisation commerciale de cette richesse permettrait d'assurer un apport en devises important. Selon les statistiques françaises et américaines, 40% des spécialités pharmaceutiques actuelles dérivent des végétaux, pour l'année 1980 leur valeur était estimée à 8 millions de dollars. (AKE ASSI - 1983; SASSON -1986).

La Côte d'Ivoire, comme la plupart des pays tropicaux, possède une flore abondante, riche en espèces médicinales, en savane comme en forêt tropicale humide (KERHARO & BOUQUET -1950 ; BOUQUET & DEBRAY - 1974; WATERMAN - 1986).

D'après AKE-ASSI (1983), le tiers environ des représentants ivoiriens de la flore phanérogamique offre un grand choix de plantes à principes actifs ou toxiques utilisables par l'homme.

La culture *in vitro* des plantes supérieures offre depuis les vingt dernières années, des outils nouveaux pour la sélection, le clonage et la propagation des plantes supérieures. La culture de cellules végétales isolées constitue, en outre, un modèle physiologique de grand intérêt pour la connaissance des voies métaboliques primaires et secondaires conduisant à la biosynthèse de composés à haute valeur ajoutée.

Cette technique permet, en outre, d'envisager la culture en masse de suspensions cellulaires végétales en vue de la production industrielle de métabolites secondaires.

Un tel procédé, dès lors qu'il est entièrement maîtrisé, présente des avantages considérables:

- La production est indépendante des conditions climatiques, pédologiques et phytopathologiques.
- Un contrôle peut être exercé sur la production de substances de caractère pharmaceutique à haute toxicité, hors des contraintes géopolitiques et des fluctuations de prix à l'exportation.
- Les acquis importants obtenus en biotechnologie des micro organismes concernant la maîtrise des procédés industriels et des cultures en masse en fermenteur peuvent être transférés, avec les restrictions imposées par les spécificités de la cellule végétale, à la production industrielle de molécules à haute valeur ajoutée.

Il convient, avant tout, d'approfondir les connaissances fondamentales sur la physiologie et la biochimie de la cellule végétale, placée dans les conditions de culture *in vitro*.

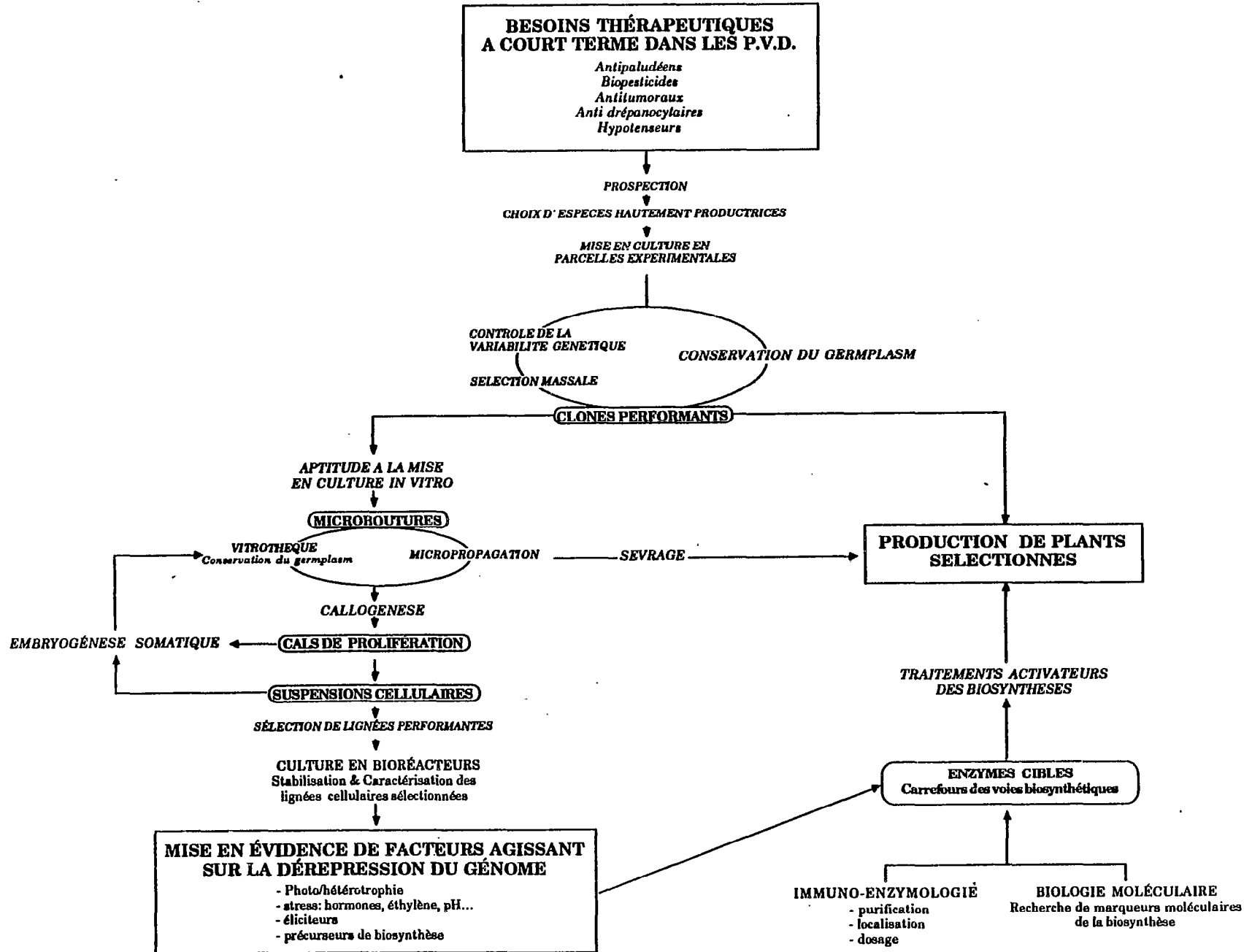


Figure n°1 : Organigramme du programme "Valorisation biotechnologique des plantes médicinales tropicales" à l'ORSTOM

Le Programme "Valorisation des Plantes Médicinales Tropicales" à l'ORSTOM

Le Laboratoire de Biotechnologie & Physiologie Végétales du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé (Abidjan-Côte d'Ivoire) s'intéresse, depuis 1985, à la valorisation biotechnologique de la flore médicinale ivoirienne.

Bénéficiant, depuis plus de vingt ans, d'acquis scientifiques importants concernant les bases physiologiques et biochimiques de la production du *cis*-polyisoprène (caoutchouc naturel) chez *Hevea brasiliensis*, ce Laboratoire s'est doté, en 1985, d'une Unité de Biotechnologie. Il a été dès lors possible de mettre à profit les connaissances acquises concernant le métabolisme secondaire de l'hévéa sur des plantes médicinales produisant des molécules à haute valeur ajoutée (biosynthèse des composés issus de la Voie Mévalonique).

Ce programme doit aboutir, par une connaissance approfondie des facteurs influant sur la dépression du génome, à la création de lignées cellulaires performantes, et, parallèlement, à la fourniture de plants hautement producteurs pour l'exploitation en plein champ. (Figure n°1)

La stratégie proposée s'échelonne en deux temps:

1) Dans un premier temps, deux plantes modèles ont été choisies, en fonction de leur aptitude à se développer *in vitro*, à partir d'une vitrothèque de plus de dix espèces connues dans la pharmacopée ivoirienne. Il s'agit de:

- *Tephrosia vogelii* (Légumineuse productrice de roténoïdes : isoflavonoïdes biodégradables à action pesticide) et

- *Abrus precatorius* (à qui plusieurs auteurs attribuent la biosynthèse d'un triterpène à action antiseptique et édulcorante: la glycyrrhizine)

Ces plantes modèles ont pour fonction de permettre la mise au point des techniques de culture *in vitro* (microbouturage, culture de cals et de suspensions cellulaires) et des méthodes d'analyse indispensables à la caractérisation physiologique et biochimique des lignées obtenues, et au dosage des métabolites secondaires. On étudie, sur ce matériel, l'impact de divers facteurs de l'environnement cellulaire agissant sur la dépression du génome: conditions d'hétéro ou de photomixotrophie (HARDY-CLARIS - 1988), actions de substances de stress et de précurseurs de biosynthèse (LAMBERT - 1989). L'apport des techniques modernes de Biologie Moléculaire permettra ensuite de mettre en évidence les marqueurs moléculaires de la biosynthèse des métabolites secondaires.

2) Dans un deuxième temps, l'ensemble des résultats obtenus avec ces systèmes modèles sera transféré sur des plantes produisant des molécules à très haute valeur ajoutée, ou correspondant à des besoins à court terme pour les Pays en Voie de Développement (antipaludéens, antitrépanocytaires,...)

***Abrus precatorius* : une plante modèle.**

Au sein du programme *Abrus*, notre propos est de :

- mettre au point les conditions d'isolement et d'entretien de lignées cellulaires dans des conditions variées (photohétérotrophie ou photomixotrophie),

- caractériser le plus complètement possible le métabolisme primaire de ces lignées. En effet, bon nombre de métabolites secondaires étant synthétisés dans les feuilles, il est important de connaître l'impact de la photosynthèse sur le métabolisme cellulaire.

Dans ce but, un grand nombre de méthodes et de techniques doit être mis au point et adaptés.

Ce programme a été initialement conçu par T. HARDY & H. CHRESTIN en 1984. Il a été ensuite mené conjointement avec Isabelle HARDY-CLARIS, qui s'est principalement intéressée à l'obtention des lignées, puis à la nutrition carbonée et à la charge énergétique et à la charge redox des cultures cellulaires obtenues. Ses recherches ont fait l'objet d'une Thèse de Doctorat (HARDY- CLARIS - 1988).

Il a été indispensable de sélectionner et d'établir, dans un premier temps un souchier statique de cals de prolifération chlorophylliens et friables. Cet important travail a été réalisé en 1984-85 par Thierry HARDY et Isabelle HARDY-CLARIS; il a abouti à la création d'une large vitrothèque d'*Abrus*. (microboutures, cals et suspensions chlorophylliens et hétérotrophes)

Etudes physiologiques et biochimiques : le cadre de notre étude

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la croissance d'une culture statique de cals photomixotrophes d'*Abrus*, afin d'optimiser les conditions de son entretien et le maintien d'une chlorophyllogénèse stable.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la nutrition minérale de suspensions cellulaires d'*Abrus* placées en conditions d'hétéro- ou de mixotrophie, et cultivées en fioles d'Erlenmeyer ou en bioréacteur expérimental. Ce travail nous a conduit à mettre au point et à adapter aux cultures cellulaires végétales diverses méthodes analytiques pour le dosage des minéraux.

Afin de mieux comprendre le comportement des différentes lignées vis à vis de certains nutriments (l'azote sous forme réduite ou oxydée, en particulier), il nous est apparu indispensable de caractériser puis de doser l'activité des enzymes impliquées dans l'incorporation du nitrate et de l'ammonium: Nitrate Réductase et Glutamine Synthétase.

Nous avons également suivi dans nos cultures l'activité des deux carboxylases impliquées dans la fixation primitive du CO₂, et donc des états d'hétéro - et de photomixotrophie: Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase et Phosphoénolpyruvate Carboxylase.

Ces études enzymologiques ont logiquement suscité des questions quant au mode de régulation des systèmes étudiés dans notre matériel *in vitro*. Grâce à l'emploi de techniques immunoenzymologiques récentes, nous avons tenté d'apporter quelques réponses.

L'ensemble de nos résultats, une fois corrélés avec les données obtenues par I.HARDY CLARIS, permet enfin d'obtenir un suivi physiologique et biochimique le plus complet possible concernant une même culture cellulaire.

CHAPITRE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A) LES CULTURES CELULAIRES VEGETALES & LA PRODUCTION IN VITRO DE METABOLITES SECONDAIRES:

Dès 1902, HABERLANDT écrivait:

"La mise en culture de cellules végétatives séparées de plantes supérieures dans un milieu nutritif simple devrait être riche d'enseignements sur les capacités que la cellule possède comme organisme élémentaire" (in: KRIKORIAN & BERQUAM - 1969).

Pionnier dans le domaine de la culture *in vitro* des végétaux, HABERLANDT obtint la survie durant quelques mois de tissus de parenchyme palissadique de *Lamium purpureum* sur un milieu de culture très simple (une solution de KNOP additionnée de saccharose). Sa tentative échoua car la seule photosynthèse des cellules fut insuffisante pour assurer la production des composés organiques indispensables à leur survie sur un milieu pauvre.

Il fallut cependant attendre 1939 pour que différentes équipes travaillant indépendamment puissent établir des cultures indéfinies de fragments d'organes végétaux. (GAUTHERET - 1939; WHITE - 1939; NOBECOURT - 1940)

GAUTHERET obtient, dès 1954, des cals friables de carotte se dissociant spontanément en cellules isolées. (in: GAUTHERET - 1959).

En 1958, MUIR, HILDEBRANDT & RIKER réalisent les premières cultures de cellules isolées issues de cals de prolifération. Cette technique a été, par la suite, largement développée grâce, notamment, aux travaux de STREET (1966) en Angleterre.

Aujourd'hui, l'intérêt des cultures *in vitro* de suspensions cellulaires végétales réside principalement en ses trois domaines d'application:

- La recherche fondamentale en cytologie et physiologie cellulaires: études physiologiques, biochimiques et enzymologiques sur la nutrition et le métabolisme d'une cellule privée de toute corrélation. C'est dans ce domaine que s'insère notre travail.

- L'Agronomie: multiplication, clonage et amélioration des espèces cultivées

- la bio-Industrie: biosynthèse et transformation de substances naturelles à haute valeur ajoutée

L'abondant ouvrage bibliographique récemment publié par BHOJWANI *et al.* (1986), regroupant plus de 12 000 références, permet d'appréhender l'importance acquise aujourd'hui par les cultures de tissus végétaux.

1) Spécificité de la cellule végétale:

Face à d'autres organismes vivants d'ores et déjà exploités industriellement, la cellule végétale constitue un système original, présentant un certain nombre de caractéristiques propres:

a) La vitesse de croissance:

Le tableau présenté ci-dessous, établi par PETIARD (1981), permet de comparer le temps de génération (Tg) et le taux de croissance maximum (μ_{\max}) moyens de divers organismes cultivés *in vitro*:

	BACTERIE	LEVURE	CHAMPIGNON FILAMENTEUX	CELLULE VEGETALE
Tg en heures	0,3	1,5	3,0	24
μ max. (h ⁻¹)	2,3	0,46	0,23	0,03

En termes de production de biomasse, la cellule végétale apparaît indiscutablement comme l'organisme le plus défavorisé en vue d'une exploitation biotechnologique.

b) La stabilité des lignées:

Concernant leur stabilité de production, les lignées cellulaires cultivées *in vitro* présentent deux types de comportement:

- La productivité peut être élevée et constante dans le temps:

De nombreux auteurs rapportent de telles situations. ZENK & DEUS (1982) ont cultivé durant plusieurs années des souches stabilisées à forte productivité (12 ans pour *Morinda citrifolia*, 8 ans pour *Coleus blumei*).

L'exploitation de telles souches peut faire l'objet d'une prise de brevet (STABA & KAUL - 1971) en vue de son exploitation industrielle. DEUS & ZENK montrent, chez *Catharanthus roseus*, une stabilité de production durable chez les lignées cellulaires isolées de plantes mères hautement productrices (1982).

- D'autres lignées présentent une productivité variable au cours des repiquages successifs:

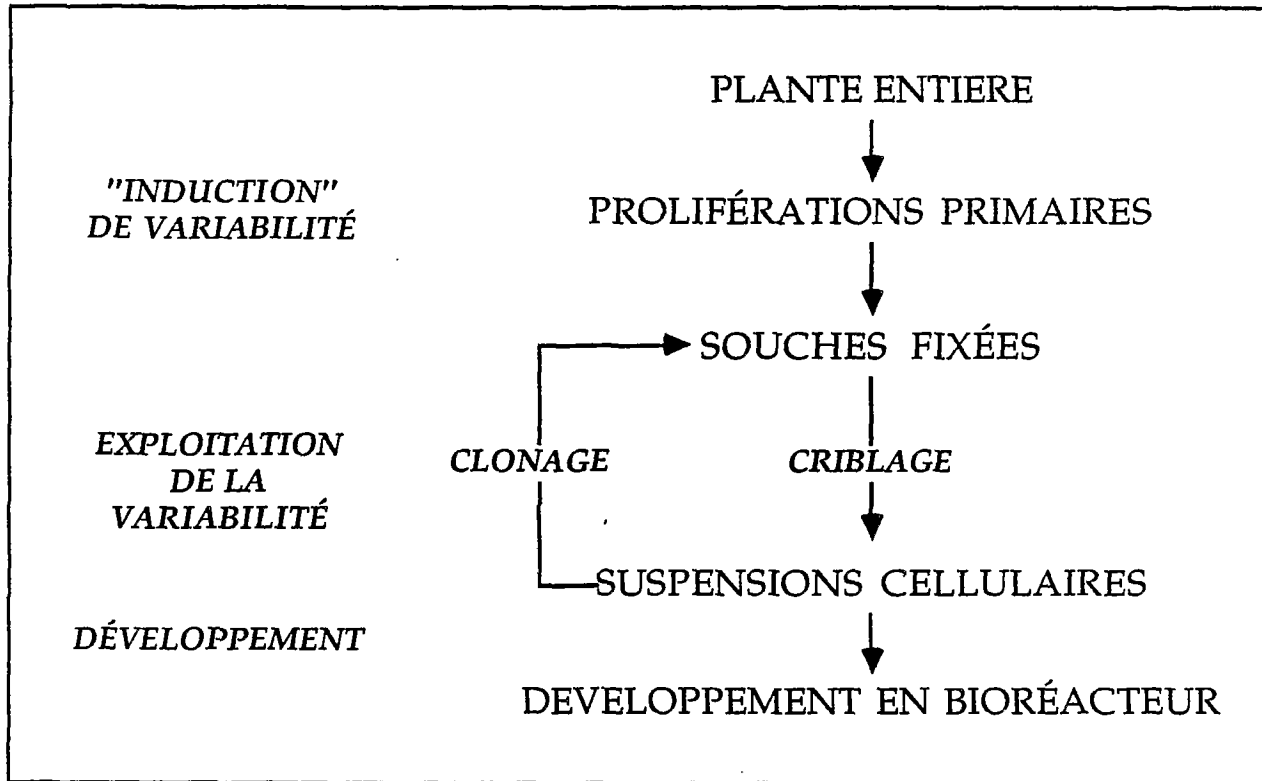
En effet, une population cellulaire est composée d'une mosaïque d'individus hétérogènes quant à leur âge, leur degré de ploïdie (MURATA & ORTON - 1982), leur productivité (SATO & YAMADA - 1984). Chaque repiquage correspond à une pression de sélection exercée sur la population, donnant seulement à une fraction de la population la possibilité de s'exprimer et de régénérer la lignée.

Un clonage de la suspension, répété, peut alors être effectué à partir de cellules isolées ou de micropopulations hautement productrices. (TABATA - 1978; ZENK - 1978; ELLIS - 1982; PETIARD - 1983).

Une telle variabilité s'exprime également au niveau de la chlorophyllogénèse. Plusieurs auteurs ont proposé des méthodes de sélection et de clonage afin de favoriser l'aptitude à la photoautotrophie de cals ou de suspensions cellulaires (YASUDA *et al.* - 1980; YAMADA & SATO - 1983).

Les plantes supérieures présentent une structure génétique infiniment plus complexe que celle des microorganismes. L'information génétique, codée par un plus grand nombre de chromosomes, est portée par le noyau, mais aussi par les chloroplastes (DYER - 1985) et les mitochondries. Les interactions multiples entre ces différents génomes (voir la biosynthèse de la Rubisco) compliquent encore l'étude des synthèses et régulations enzymatiques.

Figure n° 2 : Variabilité cellulaire dans les cultures in vitro de végétaux



d'après PETIARD (1981)

Malgré les immenses progrès accomplis par la Biologie Moléculaire au cours des dernières années, bien peu de résultats concernent la régulation, au niveau du génôme et de son expression, des voies biosynthétiques du métabolisme secondaire chez les Végétaux Supérieurs.

Le choix judicieux d'enzymes-cibles verrouillant des étapes limitantes de la synthèse, la purification et la caractérisation de ces enzymes, la mise au point d'outils immunologiques (antisérums, AcMc) et de Biologie Moléculaire (ARNm, puis ADN recombinants, sondes nucléaires radioactives) apparaissent comme autant d'obstacles à franchir.

Cependant, la variabilité cellulaire spontanée peut aussi être largement exploitée pour la sélection de lignées à haute capacité de biosynthèse. Les traitements mutagènes (irradiations, traitements chimiques) constituent des outils intéressants en vue d'élargir cette diversité. (Figure n° 2)

c) la fragilité de la structure cellulaire:

Contrairement à certains microorganismes, la cellule végétale présente une structure cellulaire de grande taille, fragile, limitée par une paroi pectocellulosique rigide. Très sensibles aux contraintes de cisaillement, les suspensions cellulaires nécessitent l'emploi de bioréacteurs à agitation ménagée. L'utilisation d'incubateurs de type "Airlift" ou l'adaptation de turbines d'agitation à profil aigu a permis dans la plupart des cas de résoudre les problèmes de lyse cellulaire par chocs mécaniques. La réponse de chaque matériel végétal à la mise en suspension, et sa résistance à la culture en bioréacteur est fonction de l'espèce végétale considérée.

2) Les potentialités biosynthétiques de la cellule végétale:

Malgré ces handicaps certains par rapport aux microorganismes, la cellule végétale possède un atout indiscutable: l'immense diversité et la complexité des métabolites secondaires dont elle est capable d'assurer la biosynthèse.

Plus de 90% du volume cellulaire est occupé par le compartiment vacuolaire, qui constitue un lieu privilégié de stockage des métabolites secondaires (voir les travaux fondamentaux de MATILE (1978), et la récente revue de MARIN - 1986).

Dès 1950, ARREGUIN & BONNER rapportent la formation *in vitro* d'isoprénoides dans les tissus de guayule. Pour la première fois, la capacité de biosynthèse d'organes végétaux cultivés *in vitro* sur un milieu artificiel était mise en évidence.

Jusqu'au début des années 70, on rapporte très peu d'exemples de synthèse de métabolites secondaires *in vitro* dans des proportions équivalentes à celles décelées dans la plante. La différenciation morphologique tissulaire induite par la mise en culture est alors considérée comme un obstacle incontournable pour la biosynthèse de la molécule considérée. (CAREW & STABA - 1965).

D'autre part, depuis 1959, TULECKE & NICKEL avaient réussi à cultiver en masse, dans un incubateur simple, des cellules de plusieurs espèces végétales.

Les travaux de ZENK *et al.* (1977) et de TABATA (1978) ont montré que les cultures *in vitro* de cals ou de suspensions cellulaires étaient capables de produire des métabolites secondaires sans exiger d'induction morphogénétique.

Ainsi, BACCOU *et al.* (1983) ont démontré l'identité structurale des saponines et sapogénines stérédiques extraites de cultures cellulaires de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.) et de plantes de plein champ.

Ces travaux ont permis d'envisager une exploitation biotechnologique du fenugrec en tant que source de précurseurs pour l'hémisynthèse de médicaments stéroïdiques : cortisoniques, hormones sexuelles, anti-inflammatoires... (RIVAL *et al* - 1983 & 1984)

L'idée d'exploiter des suspensions cellulaires pour la production de métabolites secondaires utiles, grâce à des techniques transférées de la Microbiologie Industrielle, s'est rapidement répandue. La culture de cellules végétales isolées, forte de ces nouvelles perspectives industrielles, a dès lors connu un important regain d'intérêt.

3) Technologie des bioréacteurs et potentialités industrielles: (voir l'importante revue bibliographique de STABA - 1980)

En 1959, TULECKE & NICKEL mettent au point le premier modèle d'incubateur cellulaire destiné à des cultures en masse. Ce bioréacteur, de conception très simple, a permis alors la culture de 10 litres de suspensions cellulaires de diverses espèces végétales: *Lolium*, *Rosa*, *Gyngko*. C'est un système de type Airlift, où une circulation d'air assure l'agitation de la culture. En 1960, ces mêmes auteurs décrivent des cultures menées, sur ce type d'appareil, avec des volumes de 30 à 134 litres de suspension.

Ce type de réacteur Airlift simple est souvent utilisé, aujourd'hui, au niveau du Laboratoire de recherche, pour la production en routine de biomasse cellulaire.

Néanmoins, son principal défaut réside dans l'impossibilité de séparer les fonctions d'oxygénation et d'agitation de la culture.

En outre, nous avons pu remarquer, au cours d'expérimentations préliminaires sur *Abrus precatorius* (résultats non publiés) que les réacteurs de type Airlift nécessitaient l'emploi systématique de composés tensio-actifs anti-mousse; en effet l'aération, dans ce type de contenant, doit être suffisamment intense pour assurer l'homogénéité de la suspension, provoquant alors la formation d'une importante collerette de mousse en tête de réacteur. Les cellules ramenées à la surface forment alors, sur cette collerette, des amas de macrocals importants (quelques cm) qui se maintiennent dans la cuve au cours des repiquages, rendant ainsi inutile toute sélection préalable de la suspension pour sa finesse.

La conception des bioréacteurs a ensuite évolué grâce à l'adoption de systèmes d'agitation mécaniques: par tige coudée (VERMA & VAN HUUSTEE - 1971), par barreau aimanté et agitateur magnétique (VELIKY & MARTIN - 1970).

Actuellement, de nombreuses équipes utilisent, suivant leur matériel végétal, divers types de fermenteurs initialement conçus pour la microbiologie et donc disponibles commercialement (New-Brunswick, Biolaffite, Setric). L'agitation est assurée soit par des pales entraînées mécaniquement (Stirred Jar Fermentor), soit par circulation d'air (Airlift Fermentor). Ce type de matériel est adapté à l'emploi d'électrodes et de sondes stérilisables, couplées à des dispositifs de contrôle et de régulation pour divers paramètres de culture : température, pH, pO_2 , potentiel Redox...

Nous avons ainsi pu conduire les premières cultures cellulaires de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.) en bioréacteur expérimental de deux litres adapté aux cellules végétales (RIVAL - 1983; RIVAL *et al.* - 1983 & 1984). Ce matériel nous a alors permis de suivre *in situ* l'évolution des principaux macroéléments du milieu, et de corrélérer ces données avec la croissance de la suspension et la production de métabolites secondaires : sapogénines stéroïdiques.

Différents auteurs ont décrit, à ce jour des expériences de cultures cellulaires en grand volume: de 30 à 1500 litres. (KATO *et al.* - 1975; MARTIN - 1980-a).

Tableau n° 1 : PRODUITS COMMERCIALISES OU EN COURS DE DEVELOPPEMENT

(D'après STECK & PETIARD, 1985)

PRODUIT	ESPECE	USAGE	PRIX (sous réserve)	FIRME	PAYS
Shikonine	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Pharmacie Cosmétique Teinturerie	4000\$/kg	MITSUI Petrochemicals	Japon
Berberine	<i>Coptis japonica</i> <i>Thalictrum minus</i>	Pharmacie		MITSUI Petrochemicals	Japon
Biomasse	<i>Panax ginseng</i>	Diététique	30 \$/Kg	NITTO DENKI KOGYO	Japon
Peroxydase	<i>Raphanus</i>	Diagnostic	2000 \$/Kg	TOYOBO	Japon
Geraniol	<i>Geranium</i>	Parfumerie		KANEBO	Japon
Acide rosmarinique	<i>Coleus blumei</i>	Pharmacie		NATTERMAN	RFA
Digoxine	<i>Digitalis lanata</i>	Pharmacie	3000\$/kg	BOEHRINGER	RFA

Les cultures en semi-continu (ou fed-batch) sont aujourd'hui plus largement utilisées. L'optimisation de l'acroissement en biomasse et de la productivité en métabolites secondaires s'effectue par adjonction, en cours de culture, de composés tels que : nutriments, vitamines, phytohormones, précurseurs. La totalité de la population cellulaire est ensuite récoltée en fin de culture.

Aujourd'hui, plusieurs projets industriels de production de métabolites secondaires végétaux sont d'ores et déjà opérationnels, ou en cours de réalisation: voir le tableau n° 1, établi par STECK & PETIARD en 1985.

TABLEAU N° 2
CULTURES CELLULAIRES EN PHOTOAUTOTROPHIE

AUTEURS	ANNEE	PLANTE	CONDITIONS DE CULTURE			REMARQUES
			MILIEU	LUMIERE	CO ₂	
BERGMANN	1967	<i>Nicotiana tabacum</i>	M.S. ANA 0,1 mg.l ⁻¹	5000 lux (continue)	1 % CO ₂ dans l'air	
CHANDLER <i>et al</i>	1972	<i>Nicotiana tabacum</i>	M.S. 2,4 D 0,5 µM Kin 0,2 µM	2500 lux (continue)	2 % CO ₂ dans l'air	
HUSEMANN et BARZ	1977	<i>Chenopodium rubrum</i>	M.S. 2,4 D 0,1 µM	8000 lux (continue)	solution tampon 2M KHCO ₃ / K ₂ CO ₃	
YAMADA et SATO	1978	<i>Nicotiana tabacum</i>	L.S. ANA 10 µM Kin 1 µM	14000 lux (continue)	1 % CO ₂ dans l'air	
KATOH <i>et al</i>	1979	<i>Marchantia polymorpha</i>	M.S. 2,4-D. 1 mg.l ⁻¹	13 W . m ⁻²	1 % CO ₂ dans l'air	Taux de phosphates augmenté
DALTON	1980	<i>Spinacia oleracea</i>	M.S.	120 µE.m ⁻² .s ⁻¹ (continue)	1 % de CO ₂	Culture continue
YAMADA <i>et al</i>	1981	<i>Nicotiana tabacum</i>	L.S. ANA 10 µM Kin 1 µM	8000 lux (continue)	1 % CO ₂ dans l'air	Réacteur de 5 litres
		<i>Nicotiana tabacum</i>	L.S. ANA 10 µM Kin 1 µM	8000 lux (continue)	1 % CO ₂ 14 % O ₂ 85 % N ₂	
HUSEMANN	1981	<i>Chenopodium rubrum</i>	M.S.	8000 lux (continue)	solution tampon 2M KHCO ₃ /K ₂ CO ₃	Souches autotrophiques (ni hormone, ni vitamine)

B) LES CULTURES DE CELLULES VÉGÉTALES AUTOTROPHES :

L'optimisation de la production *in vitro* de métabolites utiles doit s'effectuer dans deux voies complémentaires:

- L'amélioration du matériel biologique: grâce à une sélection de la plante mère, une exploitation de la variabilité cellulaire *in vitro* spontanée ou induite

- L'amélioration des procédés de culture: composition des milieux, actions d'effecteurs divers (précurseurs, éliciteurs...) , paramètres physiques de la culture en bioréacteur...

La sélection et l'obtention de suspensions cellulaires végétales mixotrophes ou photoautotrophes s'inscrit dans cette logique. La cellule végétale photoautotrophe est un système très spécialisé, résultat d'une différenciation intra-cellulaire complète; il apparaît très intéressant d'obtenir et de maintenir *in vitro* un tel système, afin de lui faire exprimer ses potentialités de biosynthèse dans des conditions optimales, les plus proches possibles de celles de la plante-mère.

GAUTHERET note, dès 1934, le développement de chloroplastes dans les fragments d'organes cultivés *in vitro* en conditions d'hétérotrophie.

Pus tard, divers auteurs (HILDEBRANDT et al. - 1963; VENKETESWARAN - 1965; VASIL & HILDEBRANDT - 1966) ont étudié les conditions (nutrition minérale , paramètres de culture) favorables à la synthèse de chlorophylle, dans des cultures cellulaires de plusieurs espèces végétales. L'activité photosynthétique de telles cultures a pu ensuite être mesurée (VENKETESWARAN - 1965; BERGMAN - 1967)

L'obtention et la maintenance de cultures photoautotrophes nécessite la mise en place d'une stratégie rigoureuse: HUSEMAN -1985; CHAUMONT & GUDIN - 1985-a; HARDY et al. - 1987).

- 1) Obtention de cals hétérotrophes viables et sélection visuelle des colonies tissulaires les plus chlorophylliennes.
- 2) Obtention de suspensions cellulaires fines constituée de cellules chlorophylliennes isolées à partir des cals sélectionnés
- 3) entretien et stabilisation de la lignée cellulaire en photomixotrophie
- 4) passage de la photomixotrophie à la photoautotrophie
- 5) amélioration du taux de croissance et/ou des capacités de biosynthèse de la lignée autotrophe.

La maintenance de cultures en conditions de photoautotrophie stricte n'est pas toujours réalisable; plusieurs auteurs décrivent une nécrose des lignées après quelques subcultures (DAVEY et al. - 1971)

Néanmoins, au cours des dernières années, plusieurs équipes ont réussi à maintenir durablement des cultures de cellules végétales en autotrophie. Les principales caractéristiques de ces cultures sont rassemblées dans le tableau n° 2 . La récente revue bibliographique réalisée par HUSEMAN (1985) rassemble les résultats obtenus concernant l'action de divers facteurs externes sur le passage à la photoautotrophie: lumière, source de carbone, environnement gazeux, nutrition minérale, phytohormones...

TABLEAU N° 2 (Suite)
CULTURES CELLULAIRES EN PHOTOAUTOTROPHIE

AUTEURS	ANNEE	PLANTE	CONDITIONS DE CULTURE			REMARQUES
			MILIEU	LUMIERE	CO ₂	
PEEL	1982	<i>Asparagus officinalis</i>	M.S. ANA 1 mg.l ⁻¹ Kin 0,5 mg.l ⁻¹	120 µE.m ⁻² .s ⁻¹ photopériode de 16h	1 % dans l'air	Culture continue en turbidostat
HUSEMANN	1983	<i>Chenopodium rubrum</i>	M.S.	10000 lux (continue)	solution tampon 2M KHCO ₃ /K ₂ CO ₃	Culture continue
KATOH	1983	<i>Marchantia polymorpha</i>	M.S. 2,4-D 4,5 µM	90 µE.m ⁻² .s ⁻¹ à 165 µE.m ⁻² .s ⁻¹	1 % dans l'air	Possibilité d'omettre le 2,4 D et de réaliser des cultures autotrophes.
HORN <i>et al</i>	1983	<i>Glycine max</i>	M.S. ANA 1 mg.l ⁻¹ Kin 0,2 mg.l ⁻¹	200 à 300 µE.m ⁻² .s ⁻¹	5 % dans l'air	
LA ROSA <i>et al.</i>	1984	<i>Solanum tuberosum</i>	M.S. 2,4-D 3 mg.l ⁻¹ Kin 0,2 mg.l ⁻¹	90 à 110 µE.m ⁻² .s ⁻¹ Photopériode de 16h	2 % dans l'air	
HARDY HARDY <i>et al.</i>	1984 1987	<i>Euphorbia characias</i>	M.S. ANA 1 mg.l ⁻¹ BAP 1 mg.l ⁻¹	90 µE.m ⁻² .s ⁻¹ Photopériode de 16h	2% dans l'air	Bioréacteur airlift expérimental de 2 l.
TYLER <i>et al.</i>	1986	<i>Catharanthus roseus</i>	GAMBORG B5 ANA 1mg.l ⁻¹ Kin 1mg.l ⁻¹	100 µE.m ⁻² .s ⁻¹	2% dans l'air	

1) Intérêt comme modèle physiologique:

Les cultures de cellules végétales autotrophes constituent des outils expérimentaux indispensables pour l'étude des voies métaboliques primaires et secondaires associées à l'appareil plastidial. Elles constituent un système homogène, stérile, aisément accessible aux solutés, dans lequel la majorité des cellules sont actives. (SATO *et al.* - 1987)

L'étude des modifications physiologiques lors de la reversion de la photoautotrophie à l'hétérotrophie (*et vice-versa*) constitue une approche intéressante pour élucider comment ces conditions de croissance déterminent la repression/dépression de certaines voies métaboliques.

Des études cytologiques et biochimiques des phénomènes accompagnant le verdissement ont ainsi été réalisées sur des suspensions cellulaires de Tabac. Les processus de développement intracellulaire durant le verdissement de cellules hétérotrophes *in vitro* sont à rapprocher, pour ces auteurs, de la différenciation des cellules méristématiques en cellules matures chez la plante entière. (BRANGEON & NATO - 1981; NATO *et al.* - 1981)

Plusieurs auteurs ont pu élucider, sur des cultures cellulaires autotrophes, l'action de certains facteurs influant sur la chlorophyllogénèse (voir la revue bibliographique de : HUSEMAN - 1985; les travaux de YAMADA & SATO - 1978; DALTON & PEEL - 1983; BENZ *et al.* 1984)

SATO *et al.* (1987) discutent l'intérêt des suspensions cellulaires autotrophes en tant que modèle physiologique représentatif des cellules du mésophylle. En effet, leur comportement vis à vis de la fixation du carbone est sensiblement différent (voir les données bibliographiques concernant PEPC & Rubisco dans les cultures cellulaires).

Ces auteurs comparent l'effet de plusieurs types d'herbicides sur des germinations et sur des cultures cellulaires mixo- et photoautotrophes de tabac. Ces différents systèmes permettent de comparer l'action de molécules herbicides sur des fonctions métaboliques différentes (photosynthèse, chlorophyllogénèse,...). Les résultats obtenus viennent compléter les travaux de CSEPLO & MEDGYESY (1986) sur l'inhibition de la photosynthèse par des herbicides, réalisés sur des cultures photomixotrophes de tabac.

DE KLERK-KIEBERT & VAN DER PLAS (1984) étudient l'évolution du taux en adénine nucléotides dans des cultures hétérotrophes ou photomixotrophes de soja. Des différences notables dans le métabolisme énergétique des lignées chlorophylliennes ou non ont pu être mises en évidence.

2) Photoautotrophie & métabolisme secondaire:

De nombreuses voies du métabolisme secondaire ont été, du moins pour certaines étapes, clairement localisées dans le chloroplaste.

La PAL (Phénylalanine Ammonia Liase), extraite de nombreuses espèces végétales, constitue une étape clef dans la biosynthèse des composés phénoliques. Cette enzyme a été détectée dans les chloroplastes d'un grand nombre de végétaux (SAUNDERS & Mc CLURE - 1975). Les travaux de WIERMAN (1981) et de BROWN (1981) ont par ailleurs permis de considérer les chloroplastes comme étant le site de la synthèse des flavonoïdes, et pour partie, des coumarines.

LAMBERT (1989) s'est intéressée, dans notre Laboratoire, à la biosynthèse de roténoïdes (isoflanonoïdes à action pesticide issus de la voie de biosynthèse des

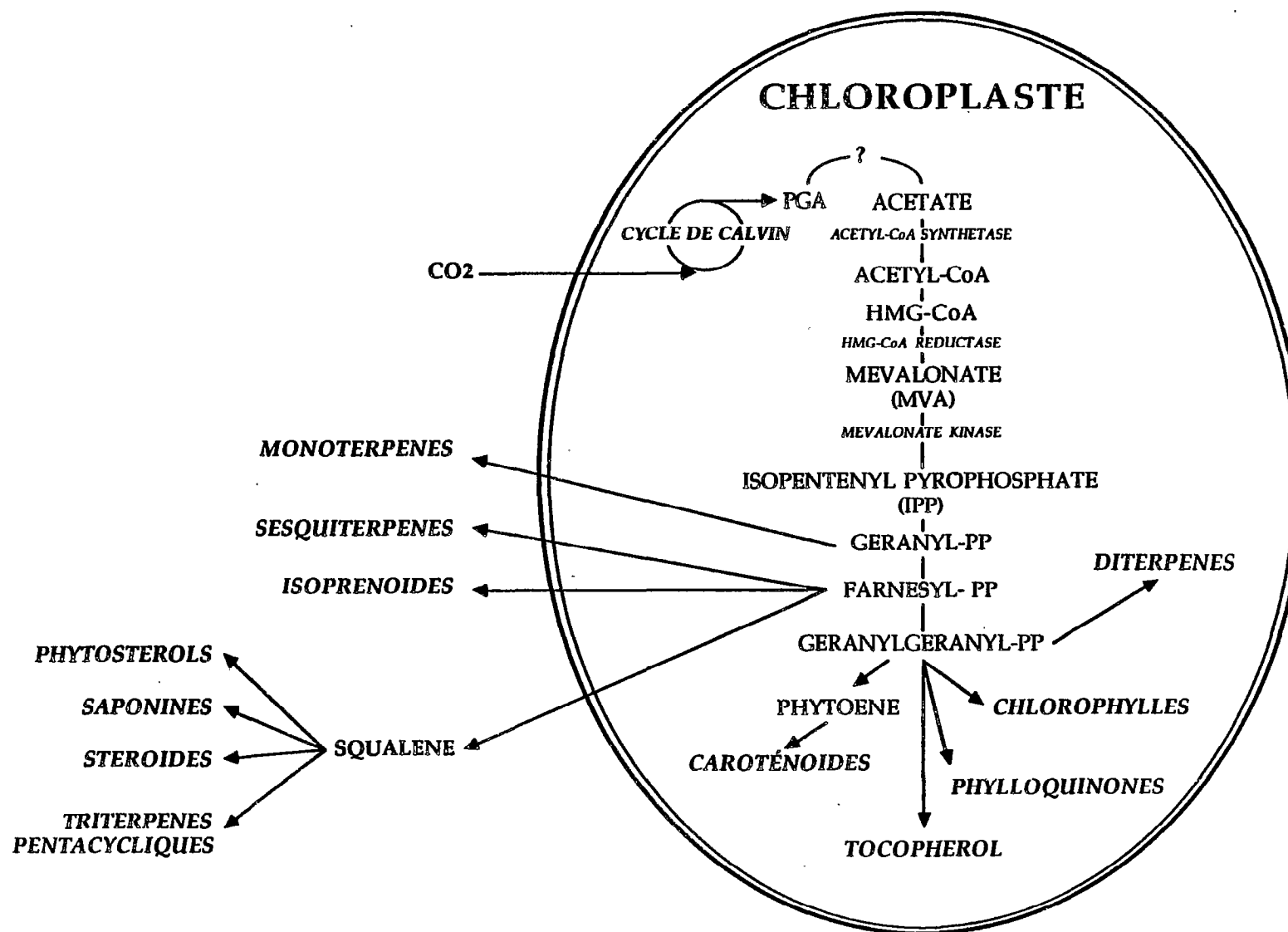


Figure n° 3 : Schéma de la compartimentation subcellulaire supposée de la biosynthèse des terpénoïdes dans une cellule végétale autotrophe.

Schéma de l'auteur d'après les travaux de: HILL & ROGERS (1966); GRUMBACH & BACH (1979); GRUMBACH & FORN (1980); KUHN et al (1981).

phénylpropanoïdes) par des suspensions cellulaires hétéro-ou photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*. Le passage à la photomixotrophie induit, sur ce matériel, d'importantes modifications portant à la fois sur la productivité et sur le spectre en roténoïdes; le rapport roténone/roténoïdes totaux passe alors de 5 à 70%.

Parmi les cibles biochimiques envisageables pour l'étude de l'impact de la photoautotrophie sur le métabolisme secondaire, la Voie mévalonique paraît particulièrement digne d'intérêt. En effet, plusieurs de ses étapes fondamentales ont été clairement localisées dans le chloroplaste: (Voir la figure n° 3)

KUHN *et al.* (1981) montrent, sur des protoplastes de feuilles de *Spinacea oleracea*, que l'incorporation de l'acétate par l'Acetyl-CoA-synthétase s'effectue dans le chloroplaste. Une autre enzyme intervenant dans la voie mévalonique a été détectée dans les chloroplastes de plantes supérieures: il s'agit de la Mevalonate kinase (HILL & ROGERS - 1974).

Une très grande activité spécifique de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl -coenzyme A -reductase (HMG-CoA Reductase) a été mesurée par GRUMBACH & BACH (1979) dans les chloroplastes de germinations de radis.

GRUMBACH & FORN (1980) mettent en évidence une autonomie complète du chloroplaste dans la synthèse d'Acetyl-CoA et de terpénoides (chaines isoprénoides latérales des chlorophylles et des plastoquinones). Ces auteurs suggèrent l'existence d'un flux de carbone à l'intérieur du chloroplaste à partir de métabolites intermédiaires du cycle de Calvin (APG, pyruvate) vers les terpènes, *via* l'Acetyl-CoA et le mévalonate présents dans les plastes.

RADIN *et al* (1982) montrent que des tissus de guayule cultivés *in vitro* à la lumière produisent jusqu'à dix fois plus de cis -polyisoprène (caoutchouc) que ceux maintenus à l'obscurité.

Les cultures de cellules végétales présentant des chloroplastes fonctionnels constituent donc un modèle expérimental particulièrement intéressant pour l'étude de la biosynthèse de métabolites secondaires issus de la Voie Mévalonique.

C) LA NUTRITION MINERALE DES CULTURES CELLULAIRES VEGETALES:

1) La nutrition minérale des cultures *in vitro*:

Les cultures de tissus végétaux *in vitro* offrent des avantages certains pour l'étude de la nutrition minérale: leur caractère stérile permet d'éliminer les interactions avec les microorganismes, simplifiant ainsi les bilans des échanges cellules/milieux. De plus, les équilibres ioniques peuvent être modifiés à volonté, et les solutions nutritives sont directement accessibles pour la cellule. Enfin, il est possible de connaître les besoins nutritionnels d'un type précis de cellules spécialisées, une fois mises en culture.

Les remarquables travaux de HELLER (1953) ont jeté les bases méthodologiques pour l'étude de la nutrition minérale des colonies tissulaires végétales. Cet auteur a mis en évidence la nécessité de fournir aux colonies tissulaires végétales les macro et micro éléments connus pour leur rôle chez la plante entière. L'effet des principaux éléments minéraux sur la croissance de cals de prolifération de plusieurs espèces végétales a été alors décrit.

Tableau n° 3

**COMPOSITION ORGANOMINERALE DE QUATRE MILIEUX
POUR LA CULTURE DE TISSUS VEGETAUX**

		WHITE -1939-	HELLER -1953-	MURASHIGE & SKOOG -1962-	GAMBORG -1968-
MACROELEMENTS (mM)					
	NO ₃	3,2	7,1	40	25
	NH ₄	-	-	20	2
	Pi	0,14	0,9	1,3	1,1
	K	1,7	10	20	25
	Ca	1,2	0,51	3	1
	Mg	3	1	1,5	1
	S	4,4	1	1,6	2
MICROELEMENTS (uM)					
	Fe	12,5	4,5	100	50
	Mn	33	0,45	100	56
	Zn	10,4	3,5	30,6	6,9
	B	23,6	16,3	100	48,2
	Cu	-	0,1	0,16	2,2
	Mo	-	-	1	1
	Co	-	-	1	1
	I	142	0,015	5	4,5
	Al	-	0,2	-	-
	Ni	-	0,12	-	-
COMPOSES ORGANIQUES (mg. l-1)					
	Acide nicotinique	0,5	-	0,5	1
	Thiamine HCl	0,1	1	0,1	10
	Pyridoxine HCl	0,1	-	0,5	1
	Glycine	3	-	2	-
	m-Inositol	-	-	100	100
	2,4-D	-	-	-	2
	AIA	-	-	1 à 30	-
	Kinétine	-	-	0,04 à 10	-
	Saccharose (g.l-1)	20	20	30	20

De nombreux auteurs WHITE (1939), GAMBORG *et al.* (1965), LINSMAIER & SKOOG (1965), MURASHIGE & SKOOG (1962), MARGARA (1978) ont recherché les milieux optimaux pour répondre à des types précis de cultures *in vitro*.

Ces recherches ont abouti à la mise au point de milieux de culture de compositions minérales très différentes, communément employés aujourd'hui en Recherche et en Production. Malgré les résultats satisfaisants qu'ils offrent dans la majorité des cas, ces milieux demandent à être adaptés à chaque matériel nouvellement mis en culture.

Ce problème du milieu de base est trop souvent résolu par le choix arbitraire d'un milieu classique, le plus souvent sans tenir compte de l'espèce ni du type de culture envisagé. Les milieux les plus communément utilisés pour les cultures cellulaires sont les solutions de WHITE, de GAMBORG (B₅) et surtout, le milieu de MURASHIGE & SKOOG, qui n'est certainement pas optimal dans tous les cas, en raison notamment de son rapport NH₄/Ntotal très élevé.

Le tableau n° 3 donne la composition comparative en macroéléments des milieux les plus couramment utilisés pour la culture de cellules végétales.

STREET a réalisé, en 1966, une revue bibliographique complète faisant le point sur l'état des connaissances concernant la nutrition organominérale et le métabolisme des cultures *in vitro* de tissus et d'organes végétaux. Cet auteur mettait alors en évidence la nécessité d'un enrichissement des solutions minérales de GAUTHERET (1939) et de WHITE (1939).

Peu d'auteurs, à notre connaissance, ont étudié conjointement les caractéristiques cinétiques de la croissance et de la nutrition minérale de suspensions de cellules végétales cultivées *in vitro*. Pourtant, l'étude du devenir, en cours de culture, des éléments minéraux mis à la disposition de la suspension permet d'obtenir des données importantes sur l'évolution du métabolisme primaire, notamment en ce qui concerne l'azote et le carbone. De plus, il importe de connaître l'adéquation des besoins nutritionnels de la cellule végétale avec la nature du milieu de culture utilisé.

THOM *et al.* (1981) ont étudié, sur des suspensions cellulaires de canne à sucre, l'évolution au cours de la culture, des nutriments extra et endocellulaires ainsi que les changements morphologiques des cellules, en relation avec les caractéristiques cinétiques du transport d'un analogue du glucose: le 3 O-méthyl glucose. Ils montrent que les ions préférentiellement consommés durant la phase exponentielle sont les phosphates, les sulfates et le potassium. Des différences importantes concernant les vitesses d'absorption de différents ions minéraux ont été mises en évidence.

Les travaux conduits par AGIER *et al.* (1983) sur des suspensions cellulaires de *Silene alba* et de *Cardamine pratensis* permettent de supposer qu'un ou plusieurs éléments du milieu de MURASHIGE & SKOOG (1962) sont en quantité insuffisante pour assurer une croissance optimale.

A l'inverse, HENRY *et al.* (1981) ne mettent en évidence aucun facteur limitant de nature minérale chez une suspension cellulaire stabilisée de *Saponaria ocymoides*. Ces auteurs utilisent, pour mettre en évidence ce facteurs limitants, la mesure de la vitesse moyenne de croissance de la suspension. Dans le cas d'un milieu parfaitement adapté à la lignée étudiée, la vitesse moyenne de croissance doit rester constante quelque soit l'inoculum cellulaire. A l'inverse, des variations de cette vitesse mettent en évidence l'insuffisance du milieu de culture en un ou plusieurs ions minéraux et doivent conduire à la recherche de facteurs limitants.

KATOH *et al.* (1980) adaptent le milieu M. & S. à la culture de suspensions cellulaires photomixotrophes de *Marchantia polymorpha*. La teneur en phosphore inorganique est portée par ces auteurs à 3,13 mM, au lieu de 1,1 mM pour le milieu de GAMBORG et 1,3 pour celui de MURASHIGE & SKOOG.

Le rapport NO_3/NH_4 optimal est fixé par ces auteurs à 2/1, montrant ainsi une adéquation satisfaisante du milieu M&S à ce matériel végétal.

2) Nutrition minérale et métabolisme secondaire:

Les cultures cellulaires végétales constituent un outil remarquable pour l'étude des relations entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire. En effet, de profondes modifications physiologiques et biochimiques interviennent dans les cellules au cours d'un cycle de culture en milieu non renouvelé. Il importe de connaître et de caractériser le plus précisément possible la séquence de ces événements, afin de comprendre les processus de régulations réciproques de ces deux grandes voies métaboliques.

Parmi les divers facteurs extracellulaires affectant la biosynthèse de composés secondaires, la composition des milieux de culture a fait l'objet de nombreux travaux, pour la plupart récents. (voir la revue bibliographique de DOUGALL - 1979)

NASH & DAVIES (1972) analysent, sur des suspensions cellulaires de *Rosa*, un grand nombre de paramètres concernant l'activité du métabolisme primaire: activité respiratoire, synthèse de protéines, d'ADN, d'ARN, de protéines, en relation avec la nutrition organominérale, et la production de polyphénols. Ces auteurs montrent qu'une importante activité métabolique se développe immédiatement après l'inoculation et atteint un pic en cours de phase exponentielle. L'accumulation de polyphénols apparaît décalée par rapport à l'évolution de ces paramètres.

BIESBOER & MAHLBERG (1979) ont mis en évidence l'impact de la composition minérale de neuf milieux de base différents sur la productivité en stérols de cals d'*Euphorbia tirucalli*. Les taux en stérols obtenus varient de 0 à 1,68 mg . g⁻¹ PMS.

Mc CARTHY *et al.* (1980), et MERILLON *et al.* (1983) ont suivi l'évolution de la consommation en éléments minéraux majeurs, en relation avec l'accumulation alcaloïdique sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*.

Sur des suspensions cellulaires de tabac, SAHAI & SHULER (1983) ont étudié l'influence de nombreux facteurs externes (température, lumière, équilibre hormonal...) et, en particulier, du rapport Carbone/Azote sur la production de composés phénoliques.

Ces auteurs mettent en évidence un antagonisme entre métabolisme azoté et synthèse des polyphénols.

Le phosphate apparaît, à la lecture de nombreux travaux, comme un facteur influant considérablement sur le métabolisme secondaire des cellules végétales.

KNOBLOCH & BERLIN (1980) notent l'effet positif d'une augmentation des phosphates externes sur la production d'alcaloïdes chez *Catharanthus roseus*. La teneur en anthraquinones dans les cellules de *Morinda* augmente avec la concentration en phosphates du milieu (ZENK *et al.* - 1975), alors que la formation de polyphénols dans les cellules d'*Hydrangea* est favorisée par une diminution du P_i extracellulaire. (SUZUKI *et al.* - 1980)

Sur des cultures cellulaires de diverses espèces végétales, SASSE *et al.* (1982) montrent un effet d'induction du Pi sur une enzyme-charnière entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire : la tryptophane decarboxylase. Cet effet est illustré par les travaux de BALAGUE & WILSON (1982) sur des cellules de *Catharanthus roseus* cultivées en conditions phosphate-limitantes.

TAL *et al.* (1982) notent sur des cultures cellulaires en continu de *Dioscorea deltoidea* une nette augmentation de la production de sapogénines stéroïdiques à la suite d'apports en phosphates durant la phase exponentielle de croissance.

HAGIMORI *et al.* (1982) adaptent le milieu de MURASHIGE & SKOOG à la biosynthèse de digitoxine par des cultures organogènes de *Digitalis purpurea*. En multipliant par trois la teneur en phosphates du milieu de base, la croissance et la productivité sont nettement améliorées.

Plus récemment, De-EKNAMKUL & ELLIS (1985) ont profondément modifié le milieu B₅ de GAMBORG afin d'optimiser la production d'acide rosmarinique chez une suspension cellulaire d'*Anchusa officinalis*.

Enfin, SATO *et al.* (1981) mesurent une nette augmentation de la croissance en photoautotrophie et de la chlorophyllogénèse des cellules de *Cytisus scoparius* en multipliant par quatre le taux initial en phosphates du milieu de LINSMAIER & SKOOG. Un effet similaire sur le taux de croissance est noté par KATO *et al.* (1980) chez des suspensions cellulaires de *Marchantia* en culture photomixotrophe.

Pour la plupart des cas décrits dans la littérature, il semble que la teneur en azote total des milieux communément utilisés (M. & S. ; L.S. ; GAMBORG B₅) doit être réduite afin d'améliorer croissance et productivité, alors que la concentration en phosphate est souvent multipliée d'un facteur 2 à 4.

Il convient de préciser que ces milieux ont été mis au point afin d'obtenir une croissance rapide des colonies tissulaires. Ceci explique leur richesse en éléments minéraux, par rapport aux solutions de KNOP ou de WHITE.

Il a été clairement démontré, pour certains métabolites, un antagonisme entre croissance cellulaire et biosynthèse; les milieux donnant une croissance optimale ne sont donc pas forcément les mieux adaptés pour augmenter la productivité des lignées. (ZENK *et al.* - 1977, TAL *et al.* - 1983)

3) cas de la nutrition azotée:

Les données disponibles concernant l'influence de la nutrition azotée sur l'activité des enzymes assurant l'incorporation de l'azote sont présentées dans le sous-chapitre D : "Etudes enzymologiques".

L'azote est nécessairement un des composants majeurs des milieux de culture, et les variations qualitatives (rapport NH₄/NO₃) et quantitatives de cet élément influencent non seulement la croissance, mais aussi la biochimie des cellules et la formation de métabolites secondaires (VELIKY - 1971).

De nombreux auteurs ont mis en évidence la complexité des phénomènes mis en jeu dans la nutrition azotée des cultures cellulaires végétales (GAMBORG *et al.* - 1968; GAMBORG & SHYLUK - 1970; BAILEY *et al.* - 1972)

KATOH et al (1980) montrent que des cellules photomixotrophes de *Marchantia polymorpha* sont incapables de croître sur un milieu renfermant une seule source d'azote (NO_3 seul ou NH_4 seul). L'inhibition de la croissance est de 87% dans ces deux cas, par rapport à une alimentation mixte.

L'ajout d'ammonium dans un milieu contenant des nitrates permet de doubler la teneur finale en protéines de suspensions cellulaires de *Rosa*; (MOHANTY & FLETCHER -1980).

VELIKY & ROSE (1973) optimisent le rapport $\text{NH}_4 / \text{NO}_3$ (1/4) du milieu de cultures de cellules de *Daucus carota* pour la production de biomasse. Pour ces auteurs, les changements de pH observés dans les différents milieux au cours de la croissance pourraient être un facteur important influençant le métabolisme azoté des cellules. Les cellules alimentées uniquement en ammonium comme source d'azote ne montrent aucune croissance, et le milieu devient très acide (pH=3,6) en fin de culture. Le pouvoir tampon du milieu joue ici un rôle considérable. Certains auteurs utilisent un milieu tamponné lorsque le NH_4 est utilisé comme seul nutriment azoté.

BEHREND & MATELES (1976) obtiennent, sur des cultures cellulaires de tabac, les mêmes résultats que GAMBORG *et al* (1970): Les cellules sont capables d'utiliser l'ammonium comme seul nutriment azoté, si des acides organiques du cycle de Krebs (citrate, malate, pyruvate) sont rajoutés au milieu de culture.

OJIMA et OHIRA (1978) considèrent que cet effet positif des acides organiques sur l'incorporation du NH_4 est dû surtout à la régulation de l'équilibre ionique des cellules, car des résultats identiques sont obtenus avec du malate ou du malonate (5-10 mM). L'efficacité de l'incorporation croît proportionnellement aux valeurs du pK des acides organiques testés, et le pyruvate (pK faible) ne montre aucun effet.

D) ETUDES ENZYMOLOGIQUES:

Pourquoi des études enzymologiques ?

Le suivi cinétique de la consommation en nutriments organominéraux du milieu ne fournit des données que sur la résultante de séries de réactions enzymatiques complexes. Il ne donne aucune indication sur la nature des voies assimilatoires mises en jeu, et ne peut donc donner lieu qu'à des interprétations physiologiques incomplètes. Or, il importe de pouvoir faire la part entre stockage et assimilation des composés minéraux prélevés dans le milieu de culture. Des études enzymologiques permettent d'affiner et de préciser les données obtenues lors de l'établissement de la cinétique de nutrition.

- Efficience de l'incorporation minérale:

La compréhension des grandes voies de la nutrition minérale conduit logiquement à l'étude des enzymes-pivots intervenant dans ces voies métaboliques. Il importe de savoir si la mise en culture *in vitro* du matériel végétal induit, par rapport à la plante entière, des modifications affectant notamment les enzymes de l'assimilation des nutriments minéraux et du carbone.

- Interdépendance des voies d'assimilation du carbone et de l'azote:

Chez les Végétaux Supérieurs, les voies anaboliques d'assimilation de l'azote et du carbone sont étroitement imbriquées, par l'intermédiaire des processus photosynthétiques (voir la figure n° 4). Les cultures cellulaires végétales permettent l'étude des systèmes enzymatiques concernés dans des conditions d'hétéro, mixo et photoautotrophie. Il est ainsi possible d'agir sur l'une ou l'autre des voies d'assimilation, indépendamment de ces états.

- Relations enzymes chloroplastiques/enzymes cytosoliques:

Les enzymes responsables de l'assimilation de l'azote et du carbone sont compartimentées dans la cellule. Certaines d'entre elles (Rubisco, Nitrite Réductase isozyme GS₂ de la Glutamine Synthétase) ont été clairement localisées dans les chloroplastes. La mesure de leur activité peut donc servir d'indicateur quant à l'efficience de l'appareil plastidial. De plus, la Rubisco est constituée de deux sous-unités placées l'une sous le contrôle du génome chloroplastique, et l'autre du génome nucléaire. Des approches immunoenzymologiques permettent aujourd'hui de faire la part entre la biosynthèse de chacune des sous-unités, mettant ainsi en évidence la régulation de l'un des deux génomes.

- Choix des 4 enzymes étudiées: carrefours des voies métaboliques

Il importe de caractériser les enzymes qui constituent des étapes limitantes bien connues dans l'assimilation du carbone et des composés minéraux. Quelques systèmes enzymatiques, dans le pool protéique élaboré par la cellule végétale, sont aptes à jouer ce rôle: ils "verrouillent" en quelque sorte, les voies d'entrée du métabolisme cellulaire.

En ce qui concerne la nutrition azotée, l'attention des auteurs s'est portée sur l'étude de la Nitrate Réductase et de la Nitrite Réductase, responsables de l'incorporation des nitrates. En outre, les enzymes de la voie Glutamine Synthétase/Glutamate synthétase, la Glutamate déshydrogénase ont été abondamment étudiées pour leur rôle fondamental dans l'assimilation de l'ammonium vers les protéines.

De même, la fixation du gaz carbonique est sous le contrôle de deux enzymes bien décrites: Rubisco et PEP Carboxylase. Elles interviennent toutes deux dans l'étape primitive de l'assimilation du CO_2 , et l'étude de leurs interrelations est souvent riche d'informations.

En outre, ces enzymes-cibles constituent autant de marqueurs potentiels des états physiologiques de la suspension cellulaire en cours de culture: états de latence, croissance exponentielle, croissance stabilisée, sénescence. L'étude cinétique de leurs activités spécifiques révèle alors de profondes modifications des voies métaboliques.

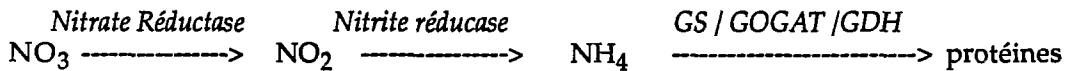
Il est intéressant de corréler ces activités entre elles, et de les rapporter éventuellement aux données enzymologiques concernant le métabolisme secondaire.

Enfin, de telles études prennent toute leur signification une fois corrélées avec d'autres paramètres biochimiques (charge énergétique, teneur en cofacteurs ...)

1) La Nitrate Réductase:

a) Fonction & Structure:

L'ion nitrate (NO_3^-) constitue la principale source d'azote pour les plantes dépourvues de symbioses fixatrices. La réduction du nitrate en ammonium (NH_4^+) constitue l'étape primaire de l'assimilation de l'azote minéral.



Cette réduction est catalysée par deux enzymes: la nitrate réductase, qui réduit les nitrates en nitrites (NO_2^-), et la nitrite réductase (NiR), qui réduit les nitrites en ammonium. Les ions ammonium sont alors incorporés dans les molécules organiques par voie d'amination.

Depuis la première description d'une activité nitrate réductase dans des extraits végétaux par EVANS & NASON (1953), un très grand nombre d'équipes se sont consacrées à son étude: purification, élucidation de la structure quaternaire, connaissance des processus de régulation. La faible activité spécifique de l'enzyme (moins de 0,1 % des protéines solubles) et sa sensibilité aux protéases n'ont permis de bien caractériser, jusqu'à ces dernières années, que la NR extraite des Végétaux Inférieurs (algues et champignons). Depuis lors, l'introduction des techniques récentes de purification telles que la chromatographie d'affinité (SOLOMONSON - 1975; OJI *et al.* - 1982) a permis l'isolement, sous forme homogène, de l'enzyme à partir de végétaux supérieurs: (CAMPBELL - 1976; KUO *et al.* - 1982- a).

La localisation subcellulaire de la NR n'est pas encore clairement élucidée. Jusqu'à ces dernières années la nitrate réductase était généralement considérée comme une enzyme cytosolique (HEWITT - 1975).

Plus récemment, des études immunologiques ont fourni des résultats contradictoires. En effet, VAUGHN *et al.* (1984) sur des cotylédons de soja, ont identifié la NR dans des vésicules cytoplasmiques, grâce à une approche par immunofluorescence. Ces auteurs confirment ainsi les résultats précédemment obtenus à l'aide de colorants utilisés pour la détermination spectrophotométrique de l'activité NR (VAUGHN & DUKE - 1981). Par contre, KAMACHI *et al.* (1987), par fixation secondaire d'anticorps marqués à l'or colloïdal, montrent que l'enzyme est associée aux chloroplastes dans les cellules d'Epinard.

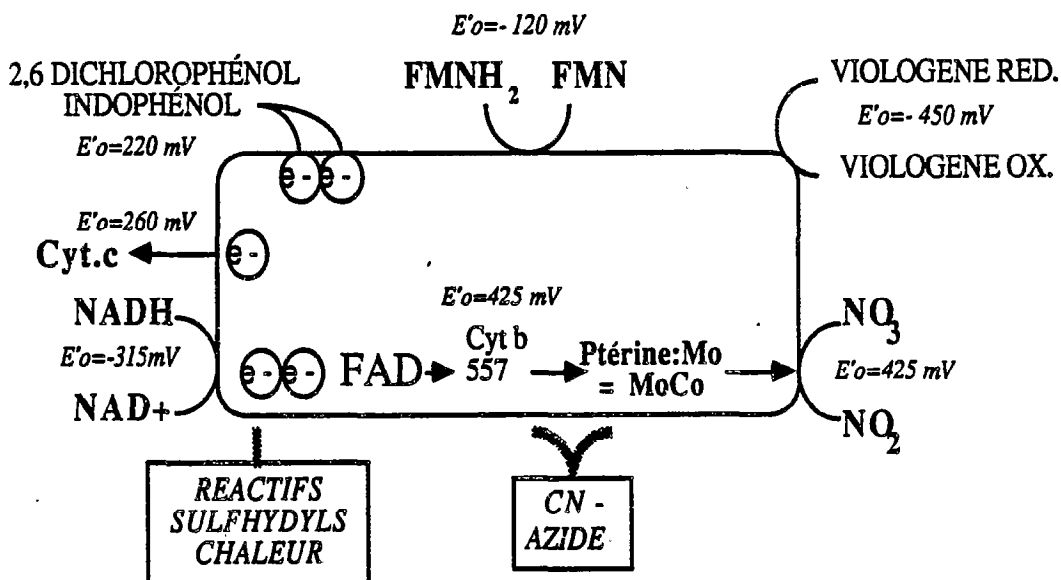
La nitrate réductase foliaire des plantes supérieures est une enzyme homo-dimérique d'un Poids Moléculaire d'environ 200 kD, qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites en utilisant le NADH comme donneur physiologique d'électrons.

Les deux sous-unités identiques de 100 Kd portent chacune un groupement FAD, un cytochrome b₅₅₇, et un atome de Molybdène associé à un noyau ptérine constituant le cofacteur à Molybdène (ou MoCo). Le MoCo représente le site actif de fixation du nitrate, mais semble aussi impliqué dans le processus de dimérisation de la protéine (KRAMER *et al.* - 1984).

L'ensemble des deux sous-unités manifeste deux activités partielles, qui participent séquentiellement au transfert d'électrons du NADH au Nitrate: La première est une activité déshydrogénase qui peut être mise en évidence avec le cytochrome c, le ferricyanure et le dichlorophénolindophénol comme accepteurs artificiels d'électrons, et

la seconde est l'activité nitrate réductase proprement dite qui peut être mise en évidence avec des flavines ou des colorants de type Méthyl viologène ou Bleu de Bromophénol à l'état réduit comme donneur d'électrons.

Le schéma ci-dessous (d'après SCHRADER *et al.* - 1968) met en évidence les modalités du transfert des électrons, ainsi que la nature des donneurs et accepteurs d'électrons exogènes, artificiels ou naturels:



d'après SCHRADER *et al.* (1968)

La cinétique, le mode de fixation des substrats (NAD(P)H, nitrate) et de libération des produits (NAD(P)+, nitrite) ne sont pas actuellement élucidés.

Plusieurs auteurs (HEWITT & NOTTON - 1980 ; GUERRERO *et al.* - 1981) ont proposé un mécanisme enzymatique de type "ping-pong" à deux sites, avec fixation non ordonnée des substrats et libération ordonnée des produits de réaction.

Les trois groupements prosthétiques décrits interviendraient dans l'ordre suivant (voir schéma ci-dessus) :



b) propriétés:

- spécificité vis-à-vis des donneurs d'électrons:

Chez les Champignons (*Neurospora*, *Aspergillus*), il semble que l'enzyme utilise spécifiquement le NADPH; (forme NADPH:NR; EC 1.6.6.3). (HEWITT & NOTTON - 1980).

Chez les végétaux supérieurs, le NADH et/ou le NADPH jouent le rôle de donneurs physiologiques d'électrons pour le site FAD de la nitrate réductase.

ESPECE VEGETALE	P.M (kD)	SOUS-UNITES	Km:NAD(P)H	Km : NO3-	pH OPTIMAL	REFERENCES
<i>Nicotiana tabacum</i> (cultures cellulaires)	200	2x 90 kD	NADH : 50µM		7.0	HOARAU et al. (1986) MENDEL et al. (1980)
<i>Cucurbita maxima</i> (cotyledons)	230	2 x 115 kD	NADH : 9µM NADH : 5 µM	50 µM 40 µM	7.5 -	CAMPBELL et al. (1978,1980,1986) REDINBAUGH et al. (1985)
<i>Glycine max</i> (feuilles)	330	-	NADH : 8,1 µM NADPH: 202 µM	- -	7,5	JOLLY et al. (1976)
<i>Hordeum vulgare</i> (feuilles)	221	2 x 110 kD	NADH: 12 µM NADPH: 270 µM	- -	7.5	DAILEY et al. (1982) KUO et al. (1982)
<i>idem</i>	-	-	NADH : 3,8 µM	270 µM	7,5	OJI et al. (1985)
<i>Hordeum vulgare</i> (racines)	-	-	NADH : 2,3 µM	130 µM	7,5	OJI et al. (1988)
<i>Spinacia oleracea</i> (feuilles)	-	-	NADH : 2,9 µM NADH : 5,0 µM	110 µM 50 µM	7.5 -	SCHRADER et al. (1968) HEWITT et al. (1980)
<i>Oryza sativa</i> (cultures cellulaires)	-	-	NADH : 147 µM	-	7,5	YAMAYA et al. (1977)
<i>Zea mays</i> (feuilles)	270	-	NADH : 2.2 µM	140 µM	-	
<i>idem</i>	194	-			-	CAMPBELL et al. (1978-1986)
<i>Zea mays</i> (racines)	190				-	REDIMBAUGH et al. (1981)

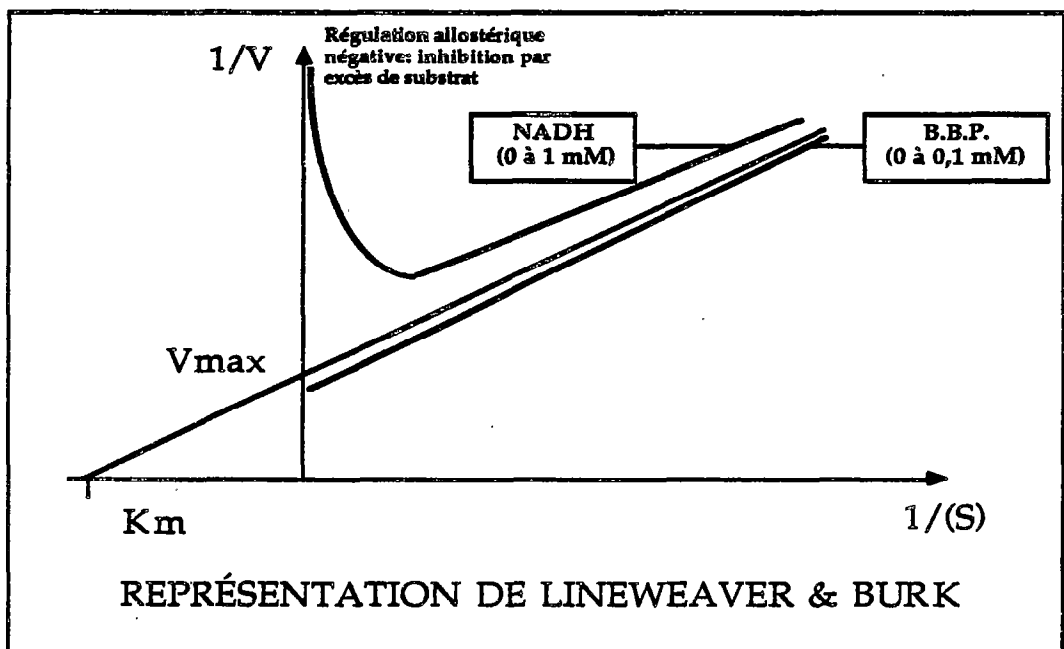
TABEAU n° 4 : RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DE NITRATES REDUCTASES EXTRAITES DE VEGETAUX SUPERIEURS

La nitrate réductase peut également accepter, *in vitro*, des électrons de la part de plusieurs donneurs artificiels. Ils sont essentiellement de trois types: Les viologènes réduits (HAGEMAN *et al.* - 1962), les flavines réduites - FMNH₂ et FADH₂ - (PANEQUE *et al.* - 1965), et le bleu de bromophénol réduit (BBPr).

L'activité BBP:NR a été très récemment mise en évidence chez les végétaux supérieurs (HOARAU *et al.* - 1986, CAMPBELL - 1986, : MEYER *et al.* - 1987).

Le bleu de bromophénol, donneur *artificiel* d'électrons, permet de mettre en évidence une activité NR sur des extraits où l'activité NADH n'est plus mesurable. La vitesse de réduction des nitrates est de 10 à 15 fois supérieure à celle observée avec le NADH (donneur *physiologique*).

Cette activité présente l'avantage considérable d'être mesurable tout au long des opérations de purification de la Nitrate Réductase, alors que la NADH:NR est rapidement inactivée. Au cours de mesures de constantes cinétiques (K_m , V_m), l'activité BBP-NR ne présente aucune inhibition par les fortes concentrations en substrat. On approche donc de manière beaucoup plus précise la mesure de la vitesse maximale de la nitrate réductase. (HOARAU - *Communication personnelle*)



Le mécanisme d'action de ces deux substrats n'est pas encore clairement déterminé, car les résultats disponibles sont souvent contradictoires: inhibition compétitive? identité ou non des sites actifs pour NADH et BBP?. (HOARAU *et al.* - 1986; MEYER *et al.* - 1987).

- constantes cinétiques:

Les constantes de Michaelis (K_m) de la NADH:NR sont très variables d'une espèce végétale à l'autre. Elles sont de l'ordre de 5 μM pour le NADH, et de 200 μM pour le nitrate. Les principales données bibliographiques disponibles sont rassemblées dans le tableau n° 4.

- labilité:

La nitrate réductase, quel que soit le matériel végétal extrait, présente, *in vitro*, une grande fragilité. La conservation et l'expression de l'activité ont pu être améliorées, dans

la majorité des cas, par l'adjonction dans le tampon d'extraction de sérum albumine bovine, de caséine, ou de PMSF, suggérant ainsi une instabilité imputable à une dégradation protéolytique. (SCHRADER *et al.* 1974; KUO *et al.* - 1982-b & 1984; TISCHNER & SCHMIDT - 1984).

Ainsi, la nitrate réductase extraite de feuilles d'orge est très fortement inactivée par une protéase à thiol, la trypsine et la papaine. (HAMANO *et al.* -1984). L'emploi d'antiprotéases (PMSF, pepstatine, leupeptine) est aujourd'hui assez répandu, car l'adjonction de protéines exogènes en concentrations importantes devient très souvent une source de problèmes lors d'opérations de purification (ultrafiltration, chromatographie). (BUCZEK - 1984; HAMANO - 1984, WRAY & KIRK - 1981). Selon BATT & WALLACE (1983), les protéases agiraient sur la structure enzymatique au niveau du complexe flavine/molybdène (MoCo), responsable de la cohésion des deux monomères constitutifs.

En effet, la NR sous forme monomérique est inactive, et l'activité NADPH:NR peut être reconstituée *in vitro* par l'action de MoCo exogène: l'enzyme est alors détectée sous forme dimérique. L'hypothèse d'une régulation post-traductionnelle de la NR par le Molybdène a été avancée par de nombreux auteurs (MENDEL & MULLER-1985)

En outre, les composés antioxydants à groupement thiol (cystéine, β -Mercaptoéthanol, DTT, glutathion réduit), les adsorbants des polyphénols (PVP) montrent une action favorable très nette sur la stabilité de l'enzyme. (WRAY & FILNER-1970, ROBIN-1979)

En maintenant la structure du groupement prosthétique MoCo, les flavines et le Molybdène exogènes concourent également à limiter la fragilité *in vitro* de la nitrate réductase. (KUO *et al.* -1982-b).

Enfin, divers facteurs d'inactivation de nature protéique ont été mis en évidence. WALLACE (1973) décèle une enzyme inactivatrice de la NR de type protéase dans des racines de maïs. En 1977, dans des cultures cellulaires de riz, YAMAYA & OHIRA ont isolé et purifié un facteur inactivateur dépourvu d'activité protéase, à site actif montrant un groupement sulfhydryl et un ion métallique. PURANIK & SRIVASTAVA (1985) impliquent un régulateur protéique spécifique dans l'action de la lumière sur la NR de feuilles de haricot.

Cette protéine régulatrice présente des caractéristiques biochimiques proches de celles décrites par JOLLY & TOLBERT (1978) et LEONG & SHEN (1982). Les mécanismes intimes de ce type d'inactivation au niveau de la molécule ne sont, pour l'heure, pas nettement élucidés (action protéolytique au niveau de la partie cytochrome c reductase, pour WALLACE - fixation d'une macromolécule régulatrice sur la NR sans dégradation pour JOLLY & TOLBERT).

c) Régulation de l'activité NR:

La régulation de l'activité NR doit être appréhendée sous deux aspects différents:

- le contrôle de la quantité d'enzyme active (*régulation traductionnelle*)
- le contrôle de l'activité spécifique de l'enzyme active (*régulation post traductionnelle*)

C'est l'équilibre entre la synthèse *de novo* de NR et la dégradation de ses formes actives (turn-over) qui régit le niveau total d'enzyme dans la cellule.

Les résultats disponibles aujourd'hui concernant la régulation de l'activité NR sont malheureusement trop épars, et souvent contradictoires. Il semble alors très difficile de proposer, pour les végétaux supérieurs, un modèle cohérent et complet.

- régulation par le nitrate:

De nombreux auteurs ont démontré l'inductibilité de la nitrate réductase par son substrat: le nitrate.

La vacuole semble être le principal lieu de stockage du nitrate (GRANDSTED & HUFFAKER - 1982). Pour FERRARI et ses collaborateurs (1973) les nitrates intracellulaires se divisent en un pool de nitrate "métabolique", mobilisable pour l'incorporation, et un pool de stockage qui reste dans la vacuole, inaccessible pour la NR.

ASLAM *et al.* (1976) suggèrent que le transfert des ions NO_3^- du milieu extérieur vers le pool de stockage, puis vers le pool assimilable, soit sous le contrôle de facteurs exogènes: lumière, disponibilité en glucose, phytohormones.

ROBIN *et al.* (1983) ont montré que le niveau des influx de NO_3^- dans le cytoplasme, à partir de la vacuole, constitue le facteur limitant de l'assimilation des nitrates, alors que ce rôle est généralement attribué à l'activité NR. La disponibilité en nitrates dans la cellule joue donc ici un rôle fondamental dans la régulation de la NR. La régulation de l'assimilation se situerait donc en amont de la NR, au niveau des flux de nitrates entre cytoplasme et vacuole.

Pour POOL & BLUMWALD (1987), l'influx de nitrate dans la vacuole s'effectue de manière passive, compte tenu de la charge positive à l'intérieur de la membrane tonoplastique (loi de NERNST). Par contre, l'efflux de NO_3^- hors de la vacuole doit s'effectuer contre le potentiel de membrane et nécessite un co-transport avec des protons. MONESTIEZ *et al.* (1987) montrent, sur des cellules d'*Acer pseudoplatanus*, que l'influx de nitrates dans la vacuole induit rapidement de profondes modifications au niveau de la vacuole: dépolarisation du tonoplaste, inhibition des pompes à protons électrogéniques (Mg-ATPases)...

Il est donc possible d'impliquer les facteurs agissant sur ces caractéristiques cellulaires (ΔpH , $\Delta\Psi$) dans la régulation post traductionnelle de la NR, *via* la disponibilité en nitrates accessibles à la réduction, dans le cytosol.

Les résultats de plusieurs équipes s'accordent pour décrire l'induction nitrique comme provoquant une synthèse *de novo* de l'enzyme. Cette néosynthèse a été mise en évidence récemment par une augmentation nette des ARN messagers spécifiques de la Nitrate Réductase. (CHENG *et al.* - 1986; RAJASHEKAR & OELMULLER - 1987)

- régulation par l'ammonium:

Chez les Champignons, l'ion ammonium, produit de la voie de réduction des nitrates, inhibe la synthèse de NR, en réprimant la transcription de son gène (GUERRERO *et al.* - 1981). Chez *Neurospora crassa*, ce serait plutôt un produit de l'assimilation de l'ammonium (glutamine?), qui réprimerait la transcription. (PREMAKUMAR *et al.* - 1979).

Les ions ammonium, suivant la nature de l'organe végétal considéré, présentent une action inhibitrice (organes aériens: feuilles, bourgeons) ou activatrice (racines) sur l'activité NR. (CAMPBELL & SMARELLI - 1986). Les résultats, sur les végétaux supérieurs, sont souvent contradictoires. C'est surtout sur les cultures *in vitro* de cellules isolées que l'effet du NH_4^+ , apporté par le milieu de culture, a été le plus étudié.

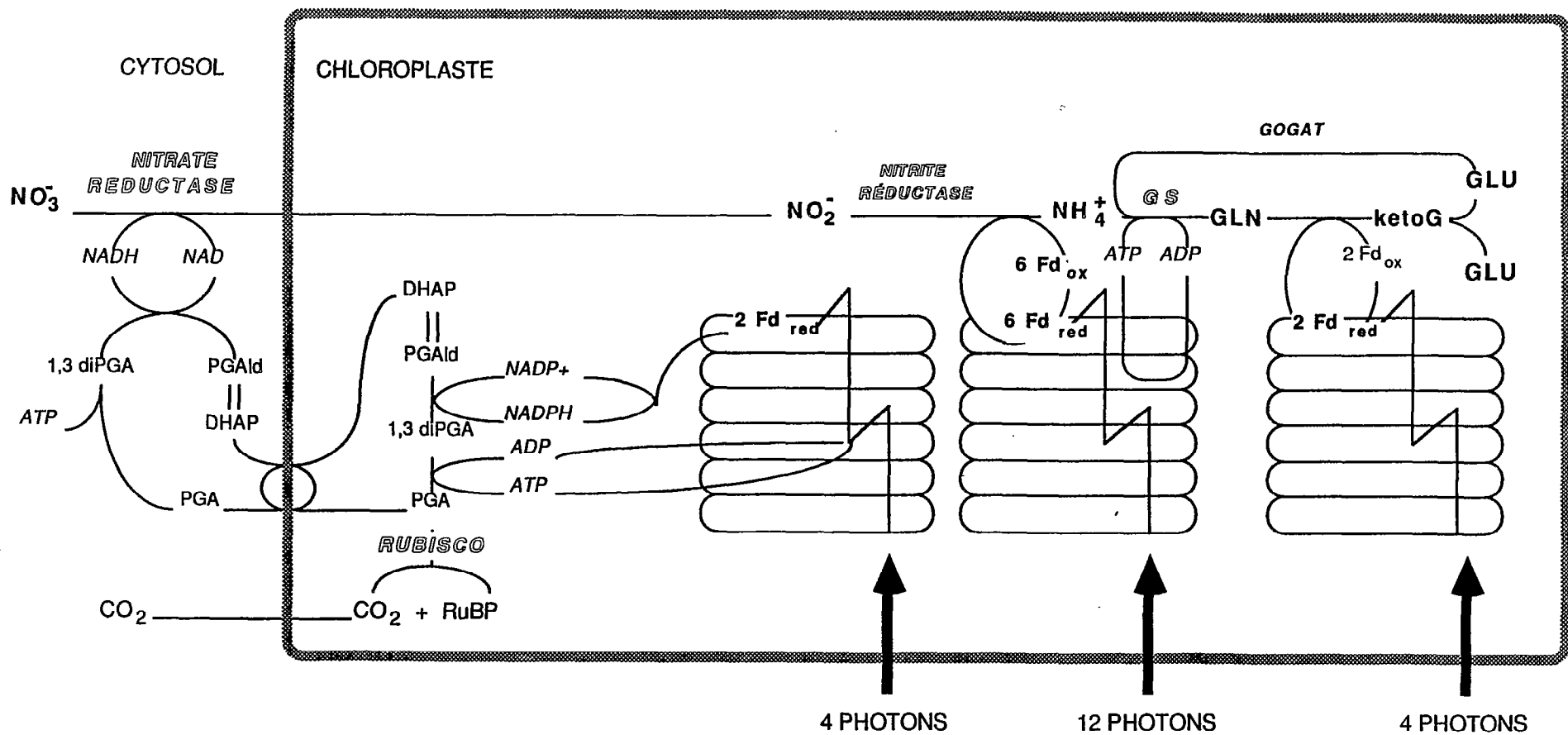


Figure n° 4 : Schéma des relations entre photosynthèse et métabolisme de l'azote chez les plantes supérieures

- divers facteurs externes de régulation:

L'influence de facteurs très différents sur l'induction et l'activité de la NR a fait l'objet de nombreux travaux: Ont ainsi été étudiées l'action des phytohormones de type cytokinines, de l'éthylène, (SHMERDER & BORRIS - 1986), des glucides (ASLAM *et al.* - 1976; 1982), de l'irradiation γ (PANDEY & SABHARWAL - 1984), du Molybdène (CAMPBELL *et al.* - 1987)...

- régulation par la lumière:

La lumière, dans de nombreux cas, présente une influence considérable sur l'apparition de l'activité NR, vraisemblablement *via* le phytochrome (DUKE & DUKE - 1984). Contrairement à l'action du nitrate, la lumière module seulement l'activité de l'enzyme préexistante, mais n'influe pas sur sa néosynthèse. L'activation de l'enzyme à la lumière peut être imputée à la présence d'une molécule de flavine, constitutrice de la NR, sensible à la lumière bleue. (RAO *et al.* - 1984). A l'obscurité, selon SAWHNEY et ses collaborateurs (1978), le pool de NADH disponible pourrait être détourné vers la respiration mitochondriale, et donc indisponible pour la réduction des nitrates.

Plusieurs auteurs ont avancé l'hypothèse d'un "facteur plastidique", synthétisé dans le chloroplaste, indispensable à la transcription même du génome, et qui serait nécessaire à l'induction de plusieurs enzymes induites à la lumière. (BORNER *et al.* - 1986; RAJASHEKAR & OELMULLER - 1987).

Enfin la lumière influe indirectement sur l'activité NR par une activation des voies photosynthétiques:

d) Assimilation du nitrate et photosynthèse:

Les relations multiples entre assimilation de l'azote et du carbone, et la photosynthèse ont souvent été décrites (BEEVERS & HAGEMAN - 1972; DEROCHE - 1983). L'assimilation des nitrates représente un coût énergétique très élevé, (SALSAC *et al.* - 1987) qui doit être assumé par les composés phosphorylés, le pouvoir réducteur et le carbone réduit fournis par la photosynthèse. (voir la figure n° 4).

Ainsi, SALSAC *et al.* (1987) estiment à 15-16 ATP par mole de NO_3 la dépense énergétique causée par la réduction du nitrate dans les plantes. En comparaison, l'incorporation de l'ammonium dans un squelette carboné par la voie GS/GOGAT ne consomme que 5 ATP.

ASLAM *et al.* (1973) ont avancé l'hypothèse d'une action de la lumière *via* l'apport de photosynthétats, qui servent de substrats à la respiration, et de fournisseurs de pouvoir réducteur. En effet, dans des feuilles d'Orge, l'apport de glucose exogène permet de limiter la perte d'activité NR à l'obscurité.

KIEPPER *et al.* (1971) proposent le schéma suivant: le NADH utilisé pour la réduction des nitrates proviendrait de l'oxydation du 3-phosphoglyceraldéhyde issu de la fixation photosynthétique du CO_2 par la Rubisco. Après migration dans le cytoplasme à partir du chloroplaste, le 3-phosphoglyceraldéhyde serait pris en charge par la triosephosphate déshydrogénase glycolytique.

SAWHNEY *et al.* (1978) montrent que le NADH produit dans la mitochondrie par le cycle de Krebs est utilisé par la nitrate réductase quand le transfert d'électrons vers l'oxygène est inhibé.

NATO et ses collaborateurs (1984) ont montré que la nitrate réductase de suspensions cellulaires de tabac photomixotrophes présente une sensibilité au DCMU (inhibiteur de la photosynthèse). ASLAM *et al.* (1973) avaient remarqué une action identique du DCMU sur la NR extraite de feuilles d'orge.

WARNER & KLEINHOF (1974) ont mis en évidence, sur des mutants d'Orge non chlorophylliens, une excellente corrélation ($r=0,92$) entre les pertes d'activité Nitrate Réductase (cytosolique) et RubP Carboxylase (chloroplastique) dues à des modifications de l'équipement chloroplastique.

De même, un mutant déficient en NR de Tabac montre un métabolisme photosynthétique altéré (SAUX *et al.* - 1986), permettant de supposer une corrélation entre les deux systèmes (SCHMIDT *et al.* - 1987).

e) Les cultures de cellules végétales: un modèle d'étude de grand intérêt.

L'étude de la régulation de la Nitrate Réductase sur des plantes entières s'est avérée très délicate, en raison des facteurs multiples impliqués dans ce processus.

Depuis les premières études sur la NR de cultures cellulaires de soja par l'équipe de A. OAKS en 1974, de nombreux auteurs ont orienté leur recherches sur la régulation de la NR vers les cultures cellulaires végétales.

En effet, les cultures de cellules isolées, dépourvues de corrélations et directement accessibles aux solutés, offrent tous les avantages d'un système modèle. Il est aisé d'y modifier totalement l'environnement immédiat de la cellule. Sur ce matériel de choix, les études enzymologiques sont venues appuyer les travaux conduits sur la nutrition azotée, en particulier les effets de l'équilibre nitrate/ammonium sur la croissance des cellules et l'induction des enzymes de l'assimilation azotée.

Des cultures cellulaires hétérotrophes de plusieurs espèces végétales ont été réalisées dans ce but:

Rosa sp. (JONES *et al.* - 1976 & 1978; CALDAS & CALDAS -1976; MOHANTY & FLETCHER - 1978), *Glycine max* et *Triticum monococcum* (BAYLEY *et al.* - 1972), *Silene alba* (POULLE & RAMBOUR -1979; RAMBOUR *et al.* - 1983).

YOUNG (1973) a étudié le comportement en chemostat de suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus*, dans un milieu où l'azote minéral était le facteur limitant de la croissance. Lors de cultures de ce type, où le nitrate est apporté par un flux continu, l'activité nitrate réductase reste constante, suggérant ainsi une synthèse continue d'enzyme. Dans ce cas, la NR apparaît clairement comme l'étape limitante de l'incorporation de l'azote. En effet, son niveau activité reste beaucoup plus faible que celle des autres enzymes d'assimilation étudiées (GS, GDH, GOT, urease, γ -glutamyl transferase).

L'adjonction de glutamate dans le milieu provoque une chute d'activité NR, confirmant les résultats de FILNER (1965) obtenus sur des cultures cellulaires de Tabac.

Dans la grande majorité des cas, lors du transfert des cellules sur un milieu neuf et non renouvelé contenant deux types de nutriments azotés (nitrate et ammonium), la nitrate réductase est très rapidement induite (après moins de trois heures), et montre un pic d'activité au cours de la phase exponentielle de croissance. (FILNER - 1965; KING & STREET - 1973; OAKS - 1974; JONES *et al.* -1976). Ce pic d'activité est observé lorsque le taux maximum en nitrates intracellulaires est atteint. De même, une induction très rapide de la NR suit l'adjonction fractionnée de nitrates dans le milieu de culture (JONES *et al.* - 1976).

De nombreux auteurs ont étudié l'impact de diverses sources d'azote du milieu de culture sur la cinétique d'apparition de l'activité NR et son intensité:

JORDAN & FLETCHER (1980) montrent, dans des suspensions de *Rosa*, une inhibition de l'activité sur un milieu mixte NO_3/NH_4 par rapport à un milieu renfermant seulement des nitrates.

CURTIS & SMARELLI (1987), NELSON *et al.* (1984), BAILEY *et al.* (1972) montrent que l'ajout d'ammonium dans le milieu n'a aucun effet sur l'activité NR chez des suspensions cellulaires de soja et de blé, infirmant ainsi les résultats obtenus par OAKS (1974) sur les cellules de soja et par MOHANTY & FLETCHER (1978) sur *Rosa*.

L'action des acides aminés (produits de l'incorporation de l'ammonium) a été largement étudiée dans des suspensions cellulaires *in vitro*. Dans la majorité des cas, ces produits inhibent l'activité NR, suggérant alors une voie de régulation possible (de type feed-back) pour l'assimilation de l'azote. (HEIMER & FILNER -1970; OAKS - 1974)

L'emploi d'inhibiteurs de la synthèse des protéines et des ARN (cycloheximide, chloramphénicol, 6-Méthyl-purine...) dans les milieux de culture a permis de confirmer la néosynthèse de la nitrate réductase dès les premières heures après le repiquage. (JONES *et al.* - 1978; POULLE & RAMBOUR - 1979; BRADFORD & FLETCHER - 1982).

Grâce à l'étude conjointe de l'action du Molybdène et des nitrates, JONES *et al.* (1978) proposent le mécanisme de régulation suivant: l'induction nitrique implique une néosynthèse d'ARNm codant pour l'apoprotéine, suivie d'une rapide activation par le Molybdène indépendante de la protéosynthèse.

Dans le cas de suspensions cellulaires photoautotrophes, CAMPBELL *et al.* (1984) notent, sur une lignée de *Chenopodium rubrum*, une augmentation notable de l'activité NR au cours de la phase exponentielle de croissance, qui se prolonge jusqu'en fin de culture. La NR apparaît dans ce cas encore comme l'enzyme limitant l'incorporation des composés azotés. En regard de la nutrition azotée, ces auteurs identifient le comportement des cellules autotrophes *in vitro* à celui des feuilles (identité des systèmes enzymatiques mis en jeu et de leurs niveaux d'activité respectifs).

Enfin, les résultats obtenus sur la modulation de l'activité NR par la composition des milieux de culture doivent être pondérés. En effet, seuls quelques auteurs rapportent, dans ce type d'études, les concentrations intracellulaires en composés azotés. Ces données seules permettent de quantifier l'impact des modifications dans les milieux de culture sur la concentration en composés accessibles à la NR.

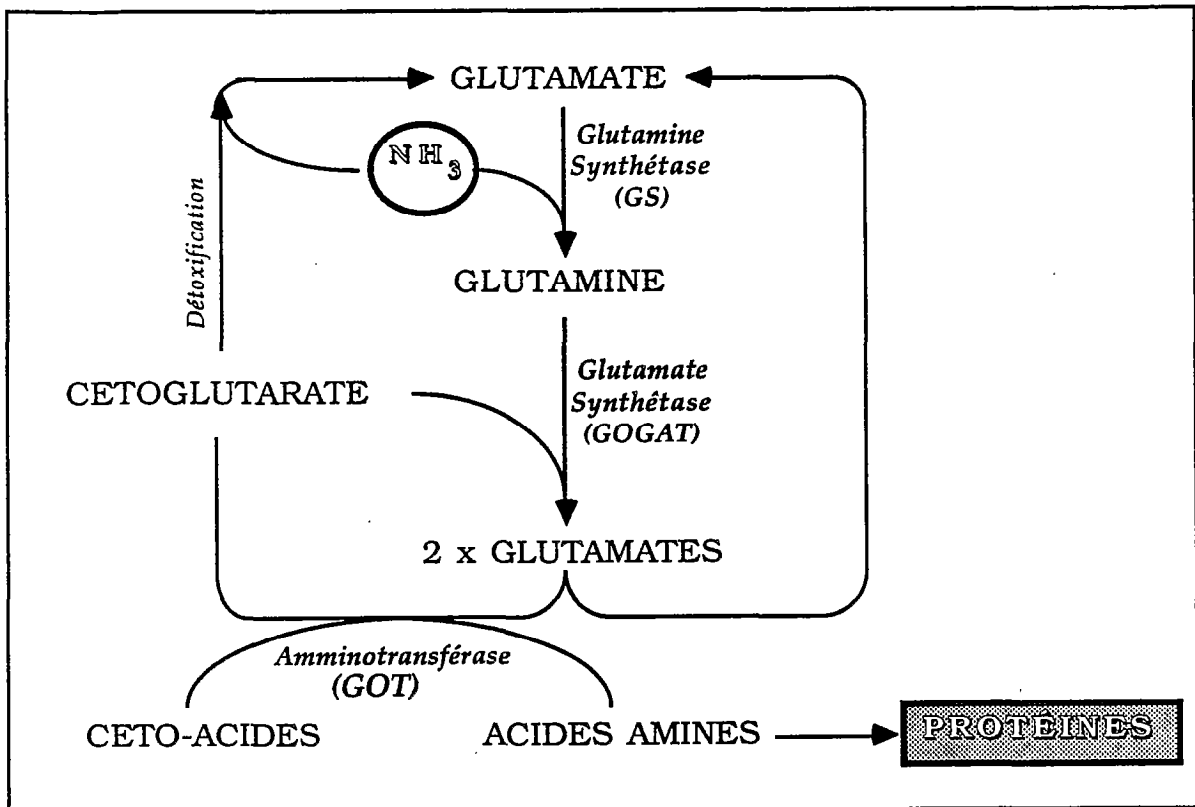
2) La Glutamine Synthétase:

a) Fonction & structure:

On considère actuellement que l'ammonium, produit de la réduction du nitrate ou de la photorespiration des végétaux chlorophylliens, peut être incorporé dans la fraction organique selon deux grandes voies:

La première, catalysée par la glutamate déshydrogénase (GDH ou L-Glutamate : NADH oxydoréductase; E.C.: 1.4.1.2) aboutit à la formation d'acide glutamique.

Figure n° 5 : Représentation schématique des grandes voies d'incorporation de l'ammonium

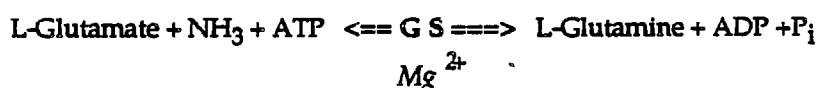


d'après GUIGNARD *et al.* (1985)

La seconde met en jeu la glutamine synthétase qui produit la glutamine, puis la glutamate synthétase, qui transforme la glutamine en deux molécules de glutamate. La voie glutamine synthétase-glutamate synthétase (GS-GOGAT) est considérée à l'heure actuelle comme essentielle à l'assimilation de l'azote chez les végétaux. C'est la voie qui est empruntée dans les conditions physiologiques normales (MIFLIN & LEA - 1976).

La Glutamine synthétase (L-glutamate: Ammonia ligase (ADP), E.C. 6. 3. 12) est présente chez tous les organismes vivants. Elle catalyse l'étape primaire de l'incorporation de l'ammonium; la glutamine ainsi formée se trouve au centre du métabolisme de l'azote, et constitue le point de départ de nombreuses voies métaboliques: biosynthèse des acides aminés, protéines, acides nucléiques, carbohydrates aminés, et cofacteurs d'oxydo-réduction (STADTMAN - 1973).

La Glutamine Synthétase catalyse la réaction suivante:



Le transfert du groupe aminé est ensuite assuré par la glutamate synthétase (ou GOGAT; E.C.: 1.4.7.1). La GOGAT a été mise en évidence chez les végétaux supérieurs par DOUGALL, en 1974. Elle est par ailleurs présente sous diverses formes isoenzymatiques: NADH, NADPH ou Ferrédoxine dépendante (SUZUKI & GADAL - 1982).



Les voies GS/GOGAT et GDH interviendraient dans la réassimilation d'une partie de l'ammonium issu de la photorespiration (LEA & MIFLIN - 1979), et auraient en outre une fonction de détoxification vis à vis de l'ammonium dans des tissus non-photosynthétisants (FOWLER & BARKER - 1979).

L'activité glutamine synthétase a été d'abord mise en évidence dans les tissus animaux (KREBS - 1935), et la majorité des travaux aujourd'hui disponibles concernent principalement l'étude de la GS et des mécanismes de sa régulation chez les micro organismes (SHAPIRO & STADTMAN - 1970; JOHANSON & GEST - 1977)

Les premiers travaux concernant la purification et la caractérisation de la GS chez les Végétaux Supérieurs ont été conduits dès 1953, sur le Pois, par ELLIOT. La Glutamine Synthétase a été depuis caractérisée dans tous les organes végétaux, avec une activité spécifique très différente d'un tissu à l'autre (HIREL -1984). Elle est souvent plus active dans les feuilles que dans les racines (GUIZ - 1979).

Des localisations subcellulaires ont permis de mettre en évidence la présence de l'enzyme dans les chloroplastes foliaires (O'NEAL & JOY 1973 - b).

D'autres auteurs (WALLSGROVE *et al.* - 1979) ont caractérisé une activité glutamine synthétase dans le cytosol, pouvant représenter jusqu'à 40% de l'activité totale de la feuille. Dans les racines, la GS semble en majorité cytosolique (OAKS & GADAL - 1979).

Chez la plupart des espèces végétales, la masse moléculaire de l'enzyme est voisine de 360 kD. Elle serait composée de 8 sous-unités identiques de 45 kD environ (O' NEAL & JOY - 1973 - a -).

Chez les Angiospermes, la présence d'un cation divalent comme le Mg^{2+} est indispensable au fonctionnement de la GS.

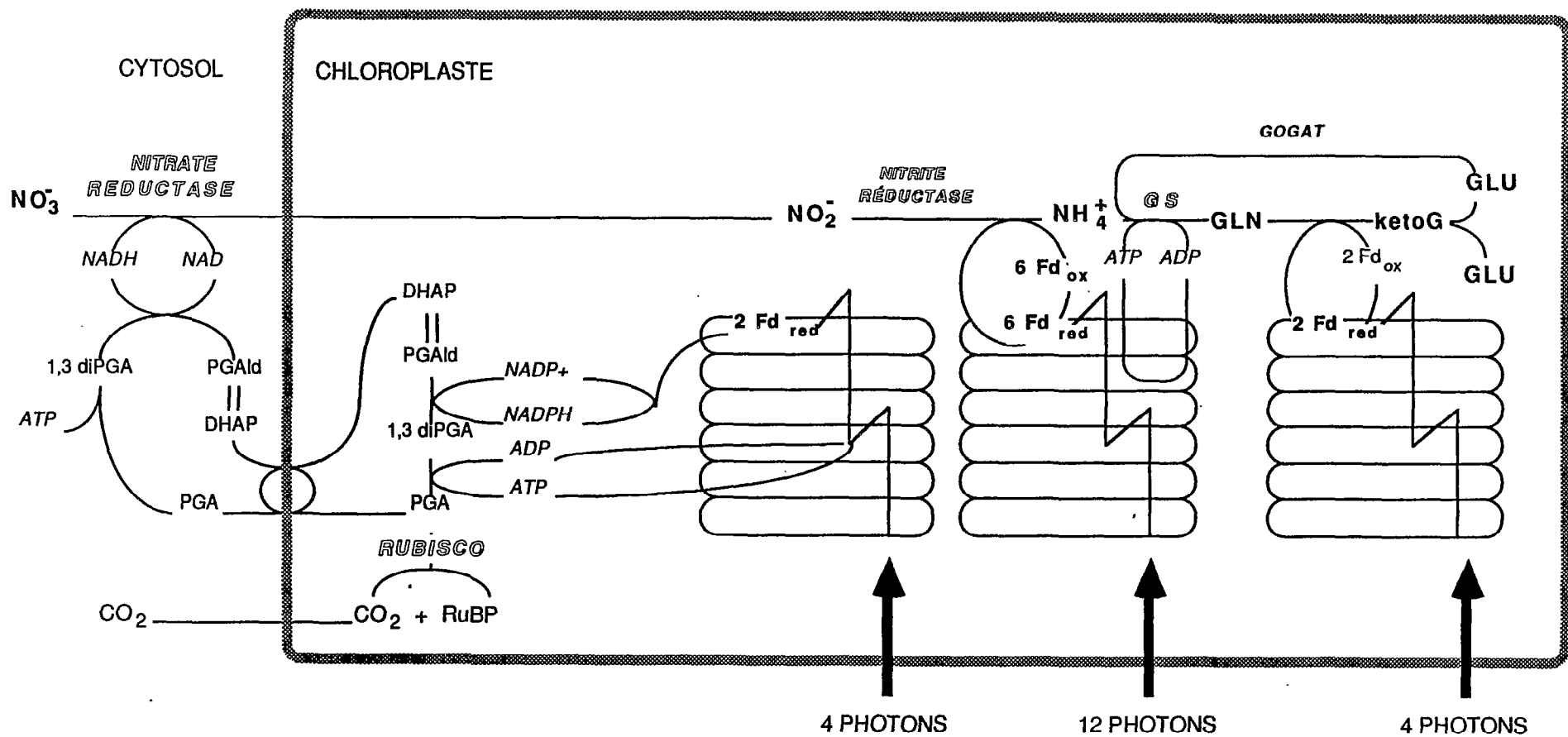


Figure n° 4 : Schéma des relations entre photosynthèse et métabolisme de l'azote chez les plantes supérieures

Les valeurs du K_m pour le glutamate peuvent varier de 1 à 13 mM suivant la concentration en Magnésium. Pour l'ATP, elles sont proches de 1 mM, mais elles sont particulièrement basses pour l'ammonium (de l'ordre de 20 μ M). La GS montre ainsi chez les végétaux supérieurs, une très grande affinité pour son substrat (NH_4^+), alors que chez les bactéries, par exemple, elle est 50 fois plus faible (HIREL - 1984).

b) régulation:

Les connaissances actuelles concernant la régulation de la glutamine synthétase des végétaux supérieurs sont encore très fragmentaires. Pour de nombreux auteurs, les mécanismes proposés pour les bactéries ou les champignons ne se vérifient pas chez les angiospermes : rétroinhibition par les acides aminés, par exemple. (voir la revue bibliographique de SHAPIRO & STADTMAN - 1970)

Cependant, une rétroinhibition par les nucléotides (ADP, AMP, GMP) a été observée chez le pois (O'NEAL & JOY - 1973-a) et les racines de riz (KANAMORI & MATSUMOTO - 1972). Ce phénomène de régulation par modulation des formes adénylées/déadénylées de la GS a été très précisément décrit chez les micro organismes. (SHAPIRO & STADTMAN - 1970; JOHANSON & GUEST - 1977)

Une régulation de l'enzyme par la charge énergétique et par les variations des concentrations en protons ou en Mg^{2+} dans le stroma du chloroplaste a été également suggérée (MIFLIN - 1977).

Jusqu'à aujourd'hui, aucune donnée nouvelle n'avait permis d'envisager un type de régulation propre aux végétaux supérieurs. Récemment, la mise en évidence de formes isofonctionnelles de la glutamine synthétase dans plusieurs organes végétaux a permis d'apporter de nouvelles réponses. GUIZ *et al.* (1979), HIREL & GADAL (1980), McNALLY & HIREL (1983), et HIREL (1984) ont révélé l'existence de deux isoformes de la GS caractérisées par des propriétés physicochimiques et enzymologiques très différentes : une forme cytosolique, appelée GS_1 , et une forme plastidiale: GS_2 .

Les proportions des deux isozymes sont très variables dans les divers organes chlorophylliens d'une même plante. En outre, les formes de GS racinaires possèdent des caractéristiques très proches de la GS cytosolique foliaire. D'autres GS cytosoliques ont été isolées dans l'albumen des graines ou des nodules racinaires des Légumineuses (HIREL -1984). Ces dernières possèdent généralement des propriétés chromatographiques et cinétiques tout à fait comparables à celles des GS cytosoliques, racinaires ou foliaires.

Certaines espèces végétales sont totalement dépourvues de l'une des deux formes (les végétaux achlorophylliens parasites sont dépourvus de la forme GS_2)

Le développement de techniques immunochimiques et de biologie moléculaire a également permis d'aborder l'étude de la régulation de la biosynthèse des isoenzymes. (HIREL *et al.* -1984). On a pu ainsi montrer que toutes les enzymes cytosoliques possédaient des déterminants antigéniques très semblables et étaient des protéines structuralement proches, quel que soit l'organe ou la plante considéré.

Ces travaux récents conduisent à l'hypothèse suivante : Le mécanisme de régulation de l'activité GS serait tributaire de l'activité chloroplastique (production d'ATP, de Mg^{2+} , de protons) *via* l'isozyme GS_2 (la forme GS_1 est insensible à la lumière). Cette régulation par la lumière de la GS chloroplastique serait alors associée aux deux autres étapes d'assimilation de l'azote minéral, catalysées par la nitrite réductase et la glutamate synthétase : GOGAT (voir la figure n° 4). Ces deux enzymes sont en effet

ferrédoxine- dépendantes et leur activité est sensible à la lumière.

L'étape suivante de l'étude de la régulation de la biosynthèse des isoformes de la GS a fait appel aux techniques de biologie moléculaire, en particulier aux synthèses de protéines *in vitro* dans un système de traduction acellulaire, suivies d'une identification des produits de traduction à l'aide d'anticorps spécifiques. (HIREL - 1984).

Aujourd'hui, des études sont en cours de réalisation dans le but de sélectionner des ADN copies correspondant à l'ARNm responsable de la synthèse de chaque isoforme. L'isolement et la séquence des gènes correspondant aux diverses isozymes ont été récemment réalisés à partir de banque génomique de soja (HIREL - 1984 et communication personnelle). Il sera alors possible d'étudier les mécanismes contrôlant l'expression de ces gènes en fonction de l'environnement (nature de la source azotée, efficacité de la photosynthèse, lumière)

c) La GS dans les cultures cellulaires végétales *in vitro*:

Les suspensions cellulaires de nombreux végétaux supérieurs sont susceptibles d'utiliser comme source d'azote aussi bien des acides aminés que le nitrate et l'ammonium (GAMBORG & SHYLUK - 1970; HEIMER & FILNER - 1970; VELIKY & ROSE - 1973; ENGVILD - 1974).

Les travaux de différentes équipes montrent une nette prédominance de la voie GS-GOGAT dans les suspensions cellulaires de plusieurs espèces: (SHOKUT *et al.* - 1978; FOWLER & BARKER - 1979; MOHANTY & FLETCHER - 1980).

L'apport d'ammonium dans les milieux nutritifs induit généralement une augmentation de l'activité GDH pouvant constituer un processus de détoxification pour la cellule (FOWLER & BARKER - 1979; GIVAN - 1979)

BRASSART *et al.* (1984) ont étudié les activités GDH et GS d'une suspension cellulaire de *Silene alba* cultivée en présence de différentes sources d'azote. Ils montrent que les cellules de *Silene* sont susceptibles d'utiliser diverses formes d'azote pour assurer leur croissance. Le remplacement du nitrate par la glutamine n'affecte pas la croissance ni le taux d'activité GS. Cette dernière apparaît dans les deux cas dès le deuxième jour de culture et se maintient jusqu'à 10 jours. L'ammonium, quant à lui, peut, en nutrition mixte ($\text{NH}_4 + \text{NO}_3$) devenir toxique. Cette toxicité s'exprime également au niveau de la GS, qui se trouve inhibée dès le 4^e jour de culture. Ces résultats confirment ceux obtenus sur les suspensions cellulaires d'Erable (FOWLER & BARKER - 1979) et de Rosier (MOHANTY & FLETCHER - 1980).

Sur une suspensions hétérotrophe, ces auteurs (BRASSART *et al.* - 1984) mettent en évidence une seule forme de GS, cytosolique. Ce résultat s'ajoute à ceux obtenus avec d'autres matériels non chlorophylliens (SUZUKI *et al.* - 1981; HIREL. *et al.* - 1984).

En outre, HIREL *et al.* (1984) ont montré, chez des mutants de Tabac dépourvus d'activité Rubisco, une altération concomitante de l'activité GS.

Se référant aux résultats similaires obtenus sur des cellules étiolées, ces auteurs suggèrent l'existence un mécanisme commun régulant ces deux enzymes lors de leur néosynthèse au cours du verdissement.

Notre programme d'étude comprend une étude cinétique de l'apparition de l'activité GS dans des cultures cellulaires hétéro-et photomixotrophes d'*Abrus precatorius*, en relation avec les activités carboxylases (PEPc & Rubisco) et Nitrate réductase.

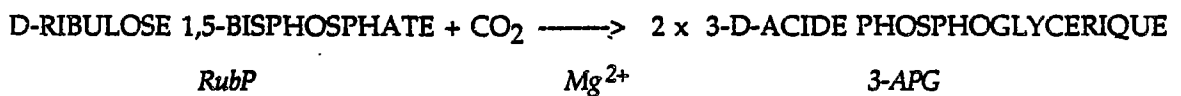
3) La Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase ou Rubisco:

a) Rôle & Structure:

La Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (EC 4.1.1.39) intervient dans la première étape du cycle des pentoses phosphates (cycle de Calvin): la fixation primaire du CO₂ sur une molécule de Ribulose bisphosphate.

Elle joue par conséquent un rôle clef dans la régulation de l'activité photosynthétique. Très abondante, la Rubisco peut constituer jusqu'à 80% des protéines solubles dans les feuilles des végétaux supérieurs. (HUFFAKER - 1982).

Exclusivement localisée dans le stroma des chloroplastes, cette enzyme catalyse donc la réaction suivante:



La Rubisco est sans doute aujourd'hui l'enzyme végétale la mieux décrite: purification, constantes cinétiques, voies de régulation, propriétés immuno enzymologiques sont aujourd'hui connues pour bon nombre de plantes supérieures (voir à ce propos les revues bibliographiques récentes de MIZIORKO & LORIMER - 1983, et de SUZUKI - 1987).

Il a été démontré que la Rubisco pouvait également catalyser l'oxygénation du D-Ribulose-1,5-bisphosphate, produisant ainsi une molécule de 3-D-phosphoglycérate et une molécule de 2-D-phosphoglycolate. Cette dernière molécule constitue le substrat primaire du cycle oxydatif photorespiratoire du carbone (OGREN & BOWES - 1971)

Cette protéine de haut poids moléculaire (550 kD) est un complexe oligomérique constitué de huit grandes sous-unités d'origine chloroplastique (LSU: 56 kD) et huit petites (SSU: 14 kD) d'origine nucléaire (RUTTNER & LANE - 1967). Toutes les plantes supérieures étudiées jusqu'à présent présentent, pour la Rubisco, la même masse moléculaire et le même nombre de sous unités (structure appelée: L₈S₈).

La structure primaire de la grande sous-unité présente une grande homologie chez les végétaux supérieurs, les algues et les cyanobactéries. (SUZUKI - 1987)

La synthèse de la Rubisco résulte donc d'interactions nucléo- chloroplastiques, et il importe de savoir si les mécanismes de sa régulation interviennent sur ces deux génomes. La disponibilité récente en outils immunologiques performants a permis de détecter séparément les sous-unités cytosolique et chloroplastique (voir le chapitre suivant : Etudes immunoenzymologiques).

b) propriétés:

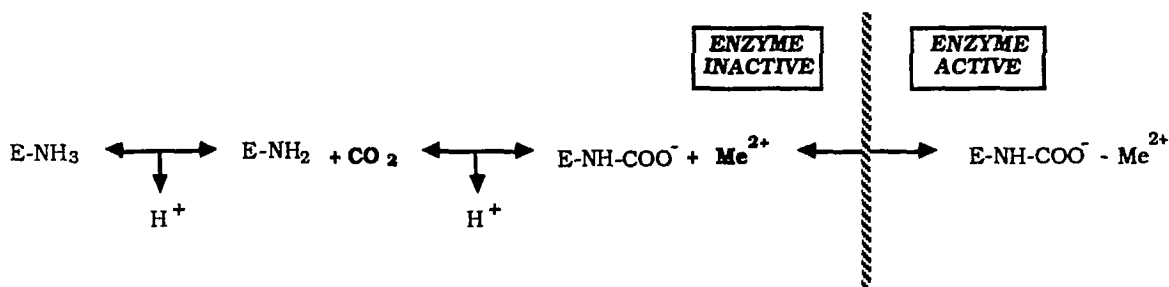
- Activation par le CO₂ et les cations divalents:

Seule la grande sous-unité porte l'activité catalytique. La SSU semble, elle, impliquée dans le maintien de la protéine dans une conformation active, mais sa présence n'est pas indispensable pour l'expression de l'activité Rubisco.

Le CO₂ joue le rôle d' activateur indispensable de l'enzyme: il se fixe sur un résidu lysine de la grande sous-unité pour former un carbamate; la fixation d'un cation métallique divalent Me²⁺ (*in vivo*: le Magnésium) induit alors la mise en place de la structure quaternaire active. La

réaction requiert deux molécules de CO_2 (l'une fixée, l'autre activatrice), pour une molécule de cation divalent.

La formation d'un complexe ternaire "enzyme- CO_2 -Métal" est indispensable à la réaction carboxylasique, l'activation de la Rubisco par le CO_2 et les cations divalents précédant la catalyse elle-même.



- Régulation par les métabolites chloroplastiques:

Divers métabolites chloroplastiques phosphorylés (6-phosphogluconate, fructose 1,6 bisphosphate, NADPH) agissent *in vitro* comme effecteurs de la Rubisco. Ils montrent tous, par ailleurs, une action d'inhibiteurs compétitifs face au RubP.

Ces molécules, suivant des données récentes en accord avec des mesures cinétiques, agiraient au niveau de la stabilisation ou de l'inactivation du complexe "enzyme- CO_2 - Mg^{2+} " et de sa fixation au niveau du même site catalytique que le RubP. (SUZUKI - 1987)

- Régulation par une protéine: la "Rubisco-activase"?

Plusieurs auteurs ont récemment suggéré l'existence d'une molécule protéique responsable de l'activation/inactivation de la Rubisco. La mise en évidence et la caractérisation de cette "Rubisco-activase" a été possible dans quelques cas (voir la récente revue bibliographique de OGREN *et al.* - 1986).

c) Rubisco et cultures cellulaires *in vitro*:

La culture de cellules *in vitro* offre un outil appréciable pour l'étude des phénomènes physiologiques et biochimiques accompagnant le verdissement, ainsi que la compartimentation des activités enzymatiques impliquées dans ces phénomènes.

NATO et ses collaborateurs (1981-b) ont suivi l'évolution des activités carboxylases (Rubisco & PEP Case) au cours du verdissement de cultures cellulaires de Tabac. Ces auteurs mettent en évidence, par des tests d'immunodiffusion d'Ouchterlony, la présence de Rubisco dans des cellules cultivées à l'obscurité. Selon ces auteurs, au cours de la mise en place de l'appareil photosynthétique, la synthèse de la LSU serait donc le facteur limitant l'assemblage d'une Rubisco fonctionnelle.

YAMADA *et al.* (1982) mesurent les activités Rubisco dans des cultures cellulaires autotrophes de *Cytisus scoparius* et de *Nicotiana tabacum*. Ces auteurs montrent que les activités rencontrées sont compatibles avec l'activité du cycle de Calvin calculée à partir des mesures d'incorporation de $^{14}\text{CO}_2$.

HAGIMORI *et al.* (1984) ont comparé l'activité Rubisco dans des cultures *in vitro* de *Digitalis purpurea* rhizogènes ou dédifférenciées, en conditions d'autotrophie stricte ou de mixotrophie. Les cellules autotrophes présentent des activités nettement supérieures, indicatrices d'un équipement chloroplastique mieux développé.

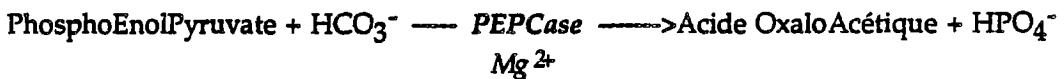
Sur des suspensions cellulaires autotrophes de *Chenopodium rubrum*, HUSEMANN (1982; 1985) note une baisse de l'activité Rubisco dans les cellules en phase de croissance active, en bioréacteur et en batch-culture.

Ces résultats, en accord avec bon nombre de travaux précédents (LESCURE - 1978; HUSEMANN - 1981; NATO *et al.* - 1981), suggèrent qu'une synthèse préférentielle des protéines cytosoliques et mitochondriales a lieu dans les cellules en prolifération active, alors que les enzymes chloroplastiques seraient synthétisées en fin de culture, en corrélation avec une chlorophyllogénèse active et une baisse de l'activité mitotique.

4) La Phosphoenolpyruvate carboxylase : PEP Case

a) Fonction & structure:

La phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase (EC 4.1.1.31) catalyse la fixation du CO₂ sur le phosphoenolpyruvate:



Localisée dans le cytosol des cellules du mésophylle, cette enzyme peut représenter jusqu'à 15% des protéines solubles dans les feuilles de Maïs.

La PEP Carboxylase (PEPc) est présente chez tous les végétaux et joue un rôle particulièrement important dans la fixation du carbone chez les plantes en C₄ et de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism).

Il existe, chez ces végétaux, une fixation primaire du CO₂ dans les cellules du mésophylle par la PEPc. Le malate produit est décarboxylé (Pyruvate + CO₂), et le CO₂ secondaire ainsi produit est pris en charge par la Rubisco dans les chloroplastes des cellules de la gaine (Cellules de Kranz). Il existe donc des différences spatio-temporelles dans l'action des deux carboxylases.

UEDAN & SUGIYAMA (1976) proposent, pour la PEPc foliaire de Maïs, une structure tétramérique rassemblant quatre sous unités de 100 kD chacune, en accord avec de nombreux travaux sur des plantes en C₄ (Revue bibliographique de: O' LEARY -1982).

Les plantes en C₄ montrent un rapport particulièrement élevé des activités PEPc /Rubisco : 2/1, alors que ce rapport est très faible : 0,1/1 chez les végétaux en C₃. (WILLIAMS & KENNEDY - 1978)

b) Propriétés:

Par son rôle fondamental dans l'assimilation du carbone, la régulation de la PEPc a fait l'objet de nombreux travaux. En outre, cette carboxylase semble impliquée dans plusieurs processus métaboliques : régulation du pH cytosolique via la synthèse et la compartimentation de l'acide malique (DAVIES-1973, VANDERHOVEN & ZRYD - 1978), synthèse des acides aminés et des protéines (NESIUS & FLETCHER - 1975)

L'action de facteurs très divers sur l'activité PEPc a été étudiée: (O'LEARY - 1982)

- *substrats*: PEP, ion carbonate
- *pH*
- *cations métalliques divalents*
- *métabolites intermédiaires du cycle de Calvin ou du cycle C.A.M.*

Dès 1955, BANDURSKI a mis en évidence le rôle indispensable de l'ion Magnésium pour l'expression de l'activité PEP carboxylase .

D'autres cations métalliques divalents, tels que le Manganèse (Mn^{2+}), peuvent agir comme activateurs de la PEPc (O'LEARY -1981). Les ions métalliques et le PEP se fixeraient sur des sites actifs différents de la protéine enzymatique.

Les constantes de Michaelis (K_m) pour le PEP sont de l'ordre de 1 mM, en présence de Mg^{2+} et à pH optimal (8,0). Ces valeurs de K_m sont en moyenne 5 fois plus fortes (compte tenu des importantes variations à l'intérieur de chaque groupe) chez les plantes en C_3 que chez les plantes en C_4 . (TING & OSMOND - 1973). Les mesures effectuées par différents auteurs donnent des valeurs de K_m (CO_2) de l'ordre de 20 μM pour les plantes en C_4 , et de 100 à 300 μM pour les plantes en C_3 . (O'LEARY - 1982).

Chez les plantes en C_4 , de nombreux métabolites ont été testés comme activateurs (Glucose-6-Phosphate), ou inhibiteurs (Malate, Oxaloacétate, Aspartate: métabolites intermédiaires du Cycle de Calvin ou du cycle C_4) de la PEPc. L'activité de l'enzyme pourrait donc être régulée par les produits en aval de son action (retroinhibition).

Il est probable que ces inhibitions, tout comme l'activation de l'enzyme par le G-6-P, mettent en jeu, au niveau moléculaire, des sites différents du site catalytique fixant le PEP.

La nature de ce site allostérique, son existence même, ne sont pas clairement établies à ce jour.

c) La PEPc dans les cultures cellulaires végétales *in vitro*:

Les cultures de cellules végétales mixo-ou autotrophes constituent, nous l'avons rappelé, un modèle de choix pour l'étude *in vitro* des voies d'assimilation du carbone.

L'évolution des activités Rubisco et PEPc au cours d'un cycle de culture cellulaire *in vitro* a été étudiée par divers auteurs (NATO & MATHIEU -1978; NISHIDA *et al.* - 1980; NATO *et al.* - 1981; HUSEMANN - 1981; YAMADA *et al.* - 1982).

Il apparait nettement, au cours de telles études, que des cellules de plantes en C_3 , une fois cultivées *in vitro* en présence d'une source de carbone exogène (saccharose), montrent, dans la plupart des cas, un comportement de cellules en C_4 , avec une fixation du carbone partiellement assurée par la PEPc.

La plupart des cultures cellulaires montrent un pic d'activité PEPc lors de la phase exponentielle de croissance : Ce phénomène, mis en évidence par de très nombreux auteurs, est concomitant avec une augmentation marquée de l'activité respiratoire (NESIUS & FLETCHER - 1973; NATO *et al.* - 1977; NISHIDA *et al.* - 1980; SATO *et al.* - 1980; HUSEMANN - 1981; SEENI & GNANAM - 1982; YAMADA *et al.* -1982; MAUREL & PAREILLEUX - 1986)

NATO & VIDAL (1983) ont mis en évidence, sur des suspensions cellulaires de Tabac photomixotrophes, la participation de la PEPc dans la fixation du $^{14}\text{CO}_2$. Cette activité atteint 50% de la fixation totale du CO_2 lorsque la population cellulaire est en phase de croissance exponentielle. Durant la phase stationnaire de culture, l'activité PEPc intervient pour seulement 10% de la fixation totale. Ces auteurs, à l'aide de tests immunoenzymologiques, ont mis en évidence une néosynthèse préférentielle de cette enzyme dès les premières heures suivant le transfert dans un milieu neuf.

L'étude de l'évolution du rapport PEPc/Rubisco au cours de la culture est riche en enseignements sur l'évolution du métabolisme carboné de la cellule. (voir à ce propos les données bibliographiques concernant la Rubisco)

Chez des suspensions cellulaires de mutants de tabac totalement dépourvus de Rubisco, la PEPc assure la fixation anaplérotique du CO_2 produit par une activité respiratoire intense (NATO & VIDAL - 1983).

Les résultats disponibles, rapportés à ceux décrits pour la plante entière (ontogénèse foliaire, par exemple) suggèrent d'attribuer à cette haute activité PEPc en début de culture une valeur de marqueur d'un état "juvénile" de la population cellulaire, où la différenciation de l'appareil photosynthétique n'est pas complète, et où les cellules sont en division actives (phases précoces de l'ontogénèse foliaire) (HEDLEY & ROWLAND - 1975; NATO & VIDAL - 1983).

Sur notre matériel végétal (cellules photomixotrophes d'*Abrus precatorius* L.) CLARIS-HARDY (1988) montre que les cellules présentent lors de cette période un comportement strictement hétérotrophe, à cause, en partie, de la non-différenciation des chloroplastes.

E) APPORTS DE L'IMMUNOENZYMOLOGIE EN PHYSIOLOGIE CELLULAIRE VEGETALE:

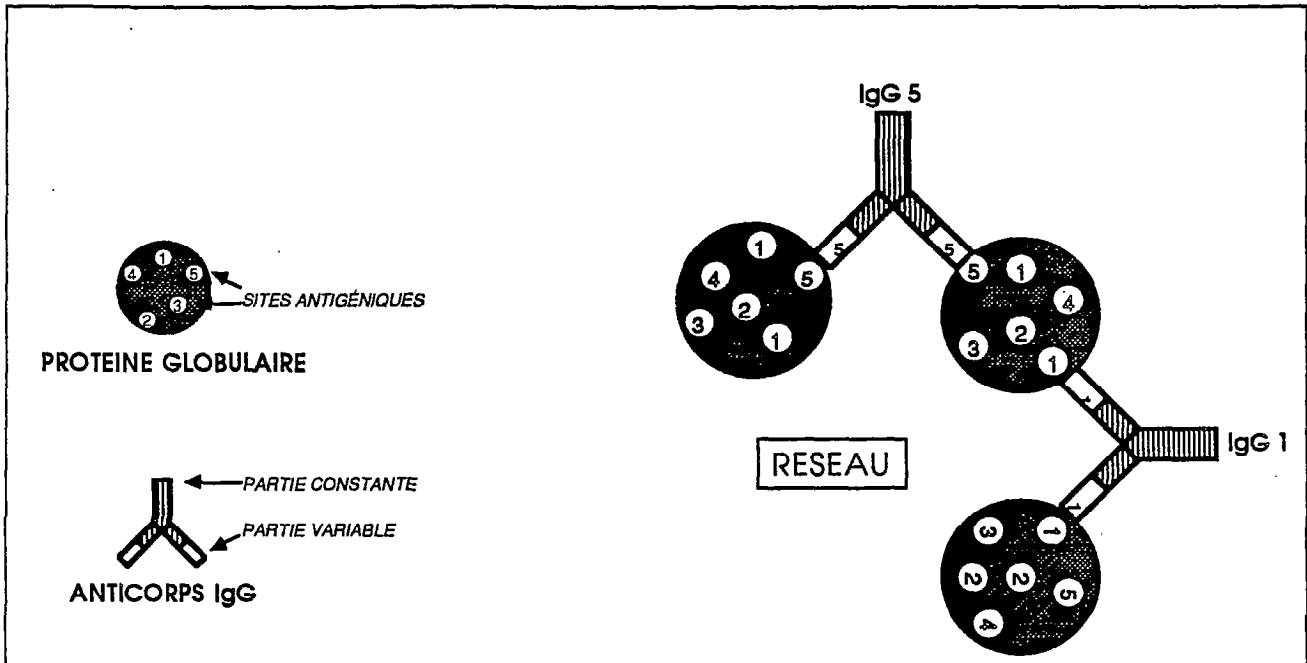
Les mesures d'activités enzymatiques se révèlent le plus souvent insuffisantes pour expliquer à elles seules les mécanismes de régulation. Bon nombre d'enzymes végétales sont connues pour leur inducibilité (Nitrate Réductase) ou leur sensibilité aux phénomènes de rétro-inhibition (Glutamine Synthétase). Ces modulations de l'activité spécifique ont été mises en évidence par des mesures classiques, mais il importe de savoir si les augmentations de l'activité sont le résultat de néosynthèses protéiques, ou d'activations de formes préexistantes de l'enzyme.

Les réactifs immunochimiques permettent aujourd'hui de mettre en évidence une enzyme, quel que soit son niveau d'activité (DAUSSANT & SKAKOUN - 1985). Les réactions immunologiques croisées ont permis d'étudier la phyllogénie de protéines fondamentales pour le métabolisme primaire (Nitrate Réductase, Rubisco, Glutamine Synthétase). En outre, il est désormais possible de quantifier pondéralement une protéine végétale grâce à des tests standardisés de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Enfin, les préparations d'anticorps polyclonaux monospécifiques sont couramment utilisés pour la purification préparative et analytique de systèmes enzymatiques végétaux (DAUSSANT & SKAKOUN - 1985).

Nota: Nous nous limiterons dans ce chapitre à l'analyse des données bibliographiques sur des travaux en immunoenzymologie concernant les systèmes

Figure n° 6 : FORMATION D'UN RESEAU D'IMMUNOPRÉCIPITATION



enzymatiques étudiés au cours de notre travail : NR, GS, Rubisco et PEPc.

Une description complète des techniques et de leurs principes est présentée au sein du Chapitre "Matériel & Méthodes".

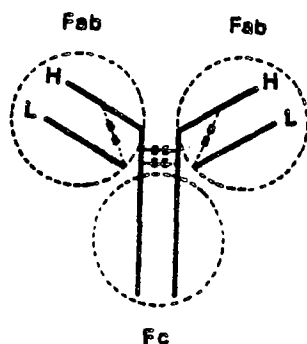
1) Les anticorps : Structure et propriétés fondamentales:

a) Les anticorps polyclonaux : (ou antisérums):

Ce sont des glycoprotéines (immunoglobulines) de caractéristiques physicochimiques hétérogènes (vitesse de sédimentation, charge électrique, poids moléculaire...), présentes dans le sérum sanguin.

On distingue, chez les Mammifères, cinq classes différentes d'immunoglobulines, selon la nature de la chaîne lourde: IgA, IgD, IgE, IgG, et IgM. Les anticorps du type IgG (Immunoglobulines G) représentent environ 70% des immunoglobulines du sérum. Ils constituent la partie biochimique du système immunitaire la mieux connue. Les IgG sont divalents: chaque molécule comporte deux sites de combinaison identiques pour l'antigène. (FOUGEREAU - 1985)

PORTER & EDELMAN (Prix Nobel - 1972) ont attribué à ces anticorps une structure multicaténaire composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes identiques (P.M.= 52 kD), et de deux chaînes légères identiques (P.M.= 23 kD). Les deux parties distales de la molécule sont responsables de la fonction de reconnaissance des antigènes ; leur structure varie suivant la nature de l'IgG. La double chaîne centrale forme la partie invariable des IgG, impliquée dans des fonctions effectrices diverses (fixation sur les récepteurs...)



Une molécule d'IgG suivant le modèle de PORTER : Les chaînes H et L sont réunies entre elles par des ponts disulfures (S-S). Le clivage par la papaïne permet d'obtenir deux fragments Fab (antigen binding) et un fragment Fc, tandis que la réduction provoque l'ouverture des ponts S-S et permet la séparation des chaînes lourdes H et légères L.

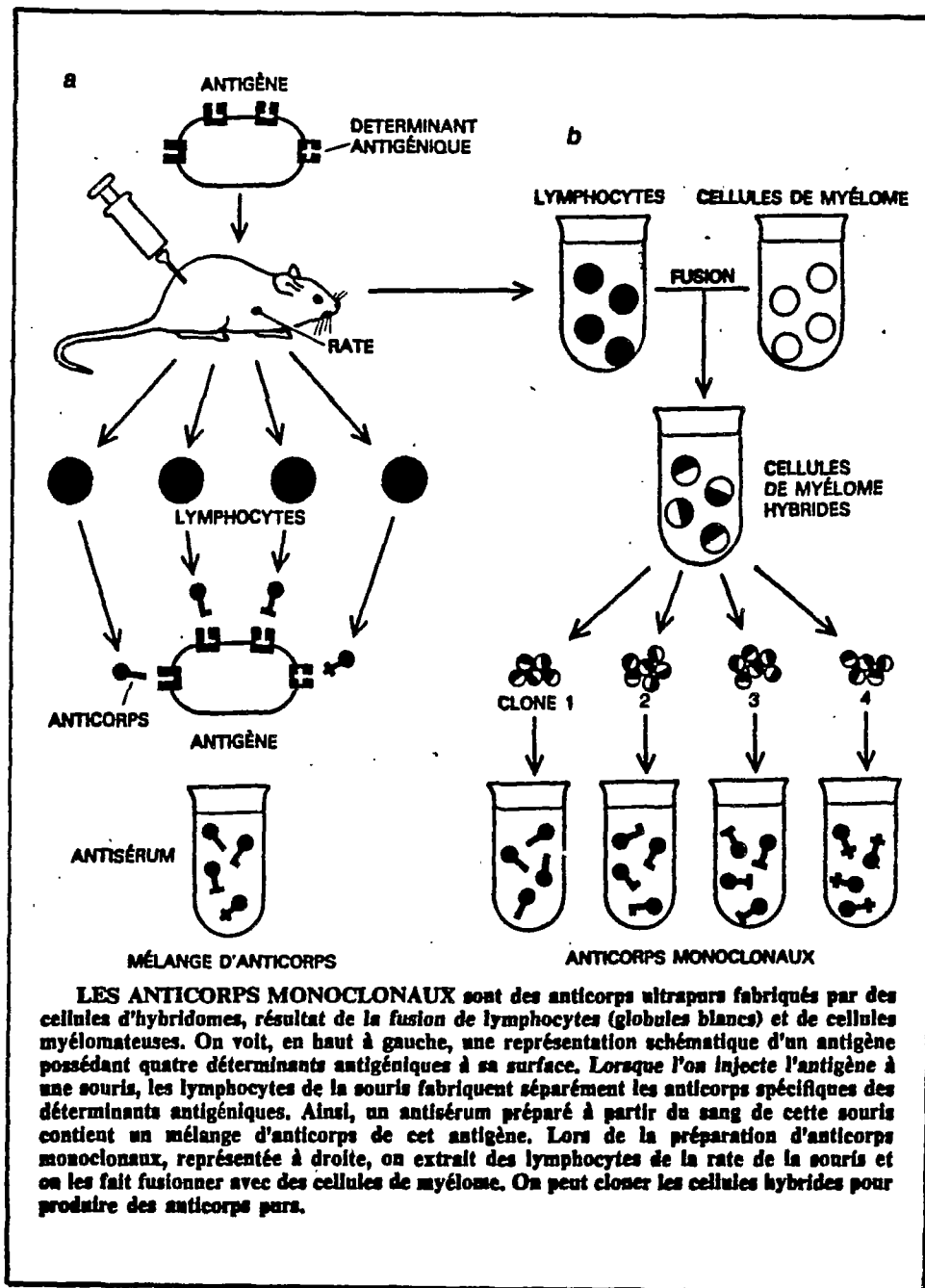
d'après FOUGEREAU (1985)

C'est la divalence de l'anticorps, alliée à la multivalence de l'antigène, qui conduit à la formation d'un important complexe macromoléculaire antigène-anticorps (réseau) qui est à l'origine de la réaction d'immunoprécipitation. La figure n° 6 montre les mécanismes de la formation de ce complexe pour une protéine globulaire.

Les caractéristiques, tant biologiques que physico-chimiques, d'un antisérum sont, en fait, la résultante de l'ensemble des propriétés de chaque anticorps présent dans le sérum. (VORA - 1985).

Nota : La fraction IgG d'un antisérum total peut être purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de type DEAE-Affigel Blue (Bio-Rad). Cette opération élimine de la fraction IgG la majorité des contaminants (protéases) exceptée la transferrine. On peut aussi réaliser cette purification en combinant un passage sur Blue Sépharose, suivi d'une chromatographie sur colonne de DEAE cellulose ou de Séphadex.

Figure n° 7 : Schéma simplifié de la préparation d'anticorps monoclonaux



d'après FOUGEREAU (1985)

b) Les anticorps monoclonaux:

Les anticorps polyclonaux, bien que rendant d'immenses services à l'immunologie, présentent un défaut majeur: on ne connaît pas, dans la quasi-totalité des cas, leur spécificité de reconnaissance antigénique. En fusionnant des lymphocytes B dotés de la propriété de synthétiser un anticorps de spécificité définie, mais que l'on ne sait pas cloner *in vitro*, avec des cellules myélomateuses (tumorales) qui vont conférer à l'hybride cellulaire ou hybridome la propriété de multiplication intensive, on peut contourner cette difficulté majeure. (Travaux fondamentaux de KOHLER & MILSTEIN - 1975; KOHLER, MILSTEIN & JERNE - Prix Nobel de Médecine 1984). Le principe de la méthode est illustré sur la figure n° 7.

L'obtention d'anticorps monoclonaux chez la souris et le rat a révolutionné l'immunologie tant pour la recherche fondamentale que pour la mise au point d'anticorps parfaitement standardisés pour le diagnostic (cancérologie, hématologie, imagerie médicale) (FAZEKAS DE ST. GROTH & SCHEIDEGGER - 1980).

L'utilisation des anticorps monoclonaux (AcMc) s'est considérablement développée au cours des dernières années, car elle a permis de résoudre un certain nombre de problèmes liés à l'utilisation des réactifs polyclonaux:

L'emploi d'AcMc n'offre pas que des avantages, et leurs potentialités d'emploi doivent être nuancées dans bien des cas. Leurs désagréments majeurs sont dus, paradoxalement, à leur caractère de monoclonalité:

- leur spécificité très restreinte peut conduire à des réponses de type "faux-négatif" (AcMc ne reconnaissant pas les formes inactives d'une enzyme), ou "faux positif" (reconnaissance d'épitopes glycosylés présents sur des antigènes très différents - HIREL : 1984 - ou interactions protéine-protéine aspécifiques - MIERENDORF & DIMMOND : 1983).

- Les caractéristiques physico-chimiques des AcMc, leur réactivité, varient considérablement d'un anticorps à l'autre, et ne sont plus gommées par l'effet de nombre existant dans un réactif polyclonal.

- La production des anticorps monoclonaux, lourde et coûteuse, pose en outre de nombreux problèmes techniques: fusion cellulaire, sélection et entretien des lignées d'hybridomes, et enfin, contrôle de la stabilité. (GALFRE & MILSTEIN-1981).

Il est évident que les AcMc restent des outils de grande valeur pour l'étude des protéines enzymatiques, par leur capacité à discriminer différents épitopes (VORA - 1985), et leur reproductibilité, qui permet de standardiser les tests de localisation et de dosage.

Les problèmes inhérents à leur grande spécificité sont le plus souvent résolus par l'utilisation de mélanges d'anticorps monoclonaux bien caractérisés.

Plusieurs équipes disposent, aujourd'hui, d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines enzymatiques végétales telles que la Nitrate Réductase (CHEREL *et al.* - 1985; MEYER *et al.* - 1987; FIDO - 1987).

2) Utilisations des antisérums en physiologie cellulaire végétale:

Nota: Une description technique détaillée des méthodes employées en immunoenzymologie végétale est présentée dans le paragraphe "Méthodes immuno-enzymologiques"

La nitrate réductase représente un modèle attractif d'étude des régulations enzymatiques; son niveau d'activité étant, nous l'avons vu, amplement modulé par des facteurs très divers.

Cependant, la connaissance des mécanismes de sa régulation se heurte à deux problèmes majeurs :

1) l'extrême labilité de la protéine rend difficile toute interprétation concernant sa synthèse et son turn-over à partir des seules mesures d'activité.

2) la NR représente, en quantité, une très petite fraction des protéines solubles totales: (<0,1%).(REDINBAUGH & CAMPBELL - 1983). Les méthodes enzymologiques classiques demeurent inadéquates pour évaluer quantitativement l'enzyme, et mettre en évidence la présence de formes actives/inactives. (CAMPBELL & SMARELLI - 1986).

HEWITT et ses collaborateurs furent, dès 1975, les premiers à préparer des anticorps anti-NR, contre un extrait de nitrate réductase semi-purifié, et à mettre ainsi en évidence une apo-enzyme inactive par immunotitration.

Les techniques immunochimiques, rarement appliquées aux enzymes végétales jusqu'à ces dernières années, sont aujourd'hui largement utilisées pour l'étude de la régulation de la NR, et sa quantification (CAMPBELL -1987).

a) Purification de systèmes enzymatiques végétaux par immunoaffinité:

- Rubisco:

La grande abondance de la Rubisco dans les organes chlorophylliens en a fait rapidement un modèle de choix pour l'étude immunoenzymologique des protéines végétales. Le problème majeur reste, pour beaucoup d'équipes, la contamination des préparations antigéniques par une autre carboxylase aux propriétés physico-chimiques proches: la PEP Carboxylase. L'utilisation de colonnes pour la chromatographie d'immunoaffinité permet d'éliminer efficacement d'une préparation enzymatique un contaminant connu. (DAUSSANT & SKAKOUN - 1985).

- Nitrate réductase:

FIDO (1987) parfait la purification de la nitrate réductase extraite de feuilles d'épinard par chromatographie d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Après traduction, par un système acellulaire, des ARN messagers codant pour une enzyme végétale (Nitrate Réductase), CALZA et ses collaborateurs (1987) isolent spécifiquement par immunosélection le polypeptide NR néosynthétisé.

b) Caractérisation qualitative :

- Tests d'immunoprécipitation ou d'immunotitration:

Ces techniques consistent à visualiser la reconnaissance spécifique de la protéine antigénique par une préparation d'anticorps, au moyen d'une inactivation de son activité ou de la formation de réseaux d'immunoprécipitation.

Par immunoinactivation croisée de l'activité, il a pu être établi que la nitrate réductase extraite de différentes plantes supérieures présentait des déterminants antigéniques communs. Une phylogénie générale de la nitrate réductase à partir d'une forme ancestrale commune a ainsi été dégagée. (SMARELLI & CAMPBELL - 1981).

Les travaux de SOMERS *et al.* (1983-a) ont montré chez l'Orge la parenté immunologique des formes à activité NADH:NR et FMNH₂:NR grâce à ces tests.

Plusieurs auteurs ont utilisé les courbes d'immunotitration pour estimer les concentrations en Rubisco présentes dans des extraits de feuilles d'Orge (KLEINKOPF *et al.* - 1970; PETERSON & HUFFAKER - 1975; FRIEDRICH & HUFFAKER - 1980).

Afin de caractériser sans ambiguïté les deux formes de la Glutamine Synthétase, Mc NALLY *et al.* (1983) présentent des courbes d'immunotitration très différentes pour chacune des isozymes.

- Tests d'immunodiffusion en gels: Ouchterlony

Des parentés immunologiques (réactions immunologiques croisées) ont été mises en évidence entre les monomères LSU extraits de plusieurs espèces végétales, grâce à des tests de double immunodiffusion en gel: Tabac/Epinard; Epinard/Mais; Epinard/Algues vertes... (SUZUKI - 1987). Ces données confirment les parentés déjà démontrées au niveau des structures protéiques primaires des grandes sous-unités.

HIREL *et al.* (1984-a) utilisent les tests d'Ouchterlony pour étudier les caractéristiques immunochimiques de la Rubisco et de la GS extraites de différentes cultures cellulaires de Tabac.

Des expériences d'immunodiffusion et d'immunoprécipitation ont montré que les isoenzymes cytosoliques et chloroplastiques de la glutamine synthétase possédaient, chez toutes les plantes, environ 10 à 30% de sites antigéniques communs.

Cependant, les anticorps polyclonaux anti-GS₂ ou GS₁ reconnaissent spécifiquement chaque isoforme. (HIREL - 1984; Mc NALLY *et al.* - 1983-b). De plus, des travaux d'immunolocalisation ont permis de confirmer la compartimentation des deux isoformes dans les organes chlorophylliens.

- Les immunoempreintes (Immunoblotting) :

Combinant la précision de la séparation des protéines par SDS-PAGE et la spécificité des révélations immunochimiques, elles offrent une solution extrêmement performante pour les analyses qualitatives de NR. Cette technique apparaît adéquate pour détecter la nitrate réductase et éventuellement évaluer son taux de dégradation (SOMERS *et al.* - 1983), et caractériser des mutants dépourvus d'activité NR (ROBIN *et al.* - 1983).

En vue de préciser la reconnaissance monospécifique IgG /protéine enzymatique, certains auteurs réalisent des immunoempreintes, en préalable à d'autres travaux immunoenzymologiques. (Immunolocalisation de la NR: KAMACHI *et al.* - 1987)

Le "western blotting" a permis en outre de confirmer les poids moléculaires apparents de la nitrate réductase sous forme native et de ses sous-unités (VAUGHN *et al.* - 1984).

Concernant la Rubisco, il est possible, par immunoempreintes, de mettre en évidence séparément les sous unités LSU et SSU. (NATO *et al.* - 1984)

c) Déterminations quantitatives spécifiques:

- immunoélectrophorèse: (*Immunorockets*)

L'immunoélectrophorèse a permis, chez l'Orge, une approche quantitative des processus de régulation de la nitrate réductase. (SOMERS *et al.* - 1983-b; SNAPP *et al.* - 1984).

Sur des suspensions cellulaires de Tabac, HIREL *et al.* (1984) ont dosé par cette technique la Glutamine Synthétase extraite de tissus mutants dépourvus d'activité Rubisco ou de type sauvage, étiolés ou non.

En 1986, YAMASHITA dose par immunoélectrophorèse la Rubisco des feuilles de *Morus alba*.

- Tests ELISA: (*Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*)

La détermination quantitative de la nitrate réductase fait largement appel aujourd'hui aux tests ELISA (CAMPBELL & RIPP - 1984; MEYER - 1986; CHEREL *et al.* - 1986). Ces auteurs utilisent un test de type double sandwich, en phase solide, permettant d'éviter les interférences avec les peroxydases présentes dans les extraits végétaux. Il est ainsi possible de détecter moins d'un nanogramme de NR dans des extraits bruts.

Une nouvelle approche pour l'étude des phénomènes de synthèse et dégradation est alors possible, basée sur une quantification pondérales de l'enzyme. (MAKI *et al.* - 1986; REMMLER & CAMPBELL - 1986; DEISING & RUDOLF - 1987).

Récemment, la Rubisco a pu être précisément quantifiée par tests ELISA, sur différents matériels végétaux. (CATT & MILLARD - 1988)

- Tests RIA: Radio Immuno Assay:

Le principe de ces méthodes (YALOW & BERSON - 1960) est semblable à celui des méthodes ELISA; ces techniques diffèrent essentiellement en ce que les éléments radioactifs (l'iode généralement), au lieu d'activités enzymatiques, sont utilisés pour le marquage (voir la revue de HUNTER - 1978)

Ces méthodes sont toujours très utilisées, mais les tests ELISA, plus simples d'utilisation et évitant l'emploi d'éléments radioactifs tout en atteignant le même niveau de sensibilité, tendent à supplanter les RIA.

Une technique de dosage radioimmunologique a été mise au point, dès 1979, par COLLATZ et ses collaborateurs, afin de doser pondéralement la Rubisco sur des feuilles d'épinard.

d) Immunolocalisation subcellulaire:

L'utilisation d'anticorps marqués à l'or ou à la ferritine permet, grâce à l'opacité aux électrons de ces composés, de détecter spécifiquement une protéine sur des préparations en microscopie électronique.

La fixation secondaire d'anticorps marqués à la fluoresceine permet, par ailleurs, de visualiser la présence d'une enzyme par microscopie optique en fluorescence.

De récents travaux d'immunolocalisation sur la Rubisco ont permis de confirmer sa présence dans le stroma chloroplastique des cellules parenchymateuses, chez les plantes en C₃. (SUZUKI - 1987).

Grâce à l'utilisation d'anticorps fluorescents, HIREL (1984) a clairement démontré l'existence d'une forme chloroplastique de la Glutamine Synthétase dans des feuilles d'épinard, et d'une forme cytosolique dans les nodules racinaires d'*Alnus glutinosa*. Des recherches plus fines en microscopie électronique utilisant le complexe Protéine A-or colloïdal ont été entreprises pour la détection de la GS (HIREL - 1984).

La localisation subcellulaire de la nitrate réductase a été étudiée par microscopie en immunofluorescence (VAUGHN *et al.* - 1984), et par fixation secondaire sur l'enzyme d'anticorps marqués à l'or colloïdal (KAMACHI *et al.* - 1987)

F) CONCLUSION GENERALE :

En conclusion générale de cette étude bibliographique, il apparaît nettement qu'un grand nombre de publications sont aujourd'hui disponibles, concernant tous les aspects de la physiologie cellulaire impliqués dans notre étude.

Si elle apparaît au lecteur par trop volumineuse, cette étude bibliographique peut, en échange, lui permettre d'aborder notre travail muni d'un minimum d'informations indispensables.

Cette abondante littérature ne traite, dans la majorité des cas, que de quelques aspects de la nutrition minérale et de l'enzymologie des suspensions cellulaires végétales.

En fait, peu d'auteurs ont, à notre connaissance, tenté une approche globale du fonctionnement de la cellule végétale cultivée *in vitro*, dans des conditions d'hétérotrophie stricte ou de photomixotrophie.

De plus, la mise en culture *in vitro*, et l'étude des conditions conduisant vers l'autotrophie n'ont jamais été tentés sur notre matériel végétal : *Abrus precatorius*.

En nous appuyant sur les méthodologies et les résultats présentés dans ce chapitre bibliographique, nous allons nous attacher à étudier et à tenter de corréler, sur la même culture cellulaire végétale, le plus grand nombre de paramètres concernant l'activité du métabolisme primaire.

CHAPITRE 2

MATERIEL & METHODES



Figure n° 8 : *Abrus precatorius* L. : 1) graines 2) tige en fleurs 3) gousses fermées.

Dessin de Zdeněk Bejček in BECKER (1986)

A) LE MATERIEL BIOLOGIQUE :

1) Description botanique : (Figure n° 8)

Le matériel végétal étudié répond à la définition botanique suivante :

- Dicotylédone dialypétale caliciflore.

- Ordre : Rosales
- Famille : Fabacées (papilionacées)
- Tribu : Phaseolées
- Genre : *Abrus* L.
- Espèce : *Abrus precatorius* L.
- Synonymes : *Abrus abrus* W.F.
Abrus maculatus Noronha
Abrus minor Desv.
Abrus pauciflorus Desv.
Abrus squamulosus E. Mey
Glycine abrus L.

- Noms vernaculaires :

Jéquirity, liane-régliasse, graine régliasse,
fève-coccinelle, cascavelle, oeil de serpent...

Abrus precatorius est une liane volubile, vivace, ramifiée, pouvant atteindre 4 mètres de longueur, à rameaux grêles, ligneux à la base.

Elle porte des feuilles alternes paripennées, comprenant 10 à 20 paires de folioles. Les inflorescences sont rassemblées en grappes axillaires de fleurs blanchâtres ou rose-violet. De petites gousses tomenteuses et trappues - 3 cm environ - contiennent de 4 à 6 graines ovoïdes facilement reconnaissables, de couleur rouge vif avec une tache noire au niveau du hile. (Voir la Planche n°1 en Annexe)

Abrus precatorius est une espèce pantropicale qui se rencontre dans toutes les formations secondaires (Afrique tropicale, Antilles, Inde, Iles de l'Océan Indien...). En Afrique intertropicale, sa répartition est essentiellement forestière, avec des prolongements en savane.

2) Données ethnobotaniques - utilisations traditionnelles :

Les graines d'*Abrus*, grâce à leur couleurs originales, ont largement été utilisées comme élément de décoration, notamment en Afrique, où on les rencontre souvent sur les masques, les colliers et divers ornements. A cause de leur taille régulière, les graines étaient jadis utilisées comme poids à peser l'or. (MARCHE-MARCHAND - 1965).

Cette liane très commune est fréquemment employée dans les pharmacopées traditionnelles à travers le monde (KERHARO & ADAM - 1974 ; BOUQUET & DEBRAY - 1974 ; PERRY - 1980, ADJANOHOOUN *et al* - 1980).

Plusieurs de ses vertus thérapeutiques sont comparables à celles de la Réglisse : *Glycyrrhiza glabra* L. (SHAH & BHATT- 1973, CHONKEL - 1985). En effet, les feuilles présentent les mêmes propriétés antitussives, antiasmthiques, antiseptiques et anti-inflammatoires.

Ces nombreuses activités, ajoutées à un fort pouvoir édulcorant des extraits de feuilles, ont conduit bon nombre d'auteurs à identifier le principe actif d' *Abrus* comme un hétéroside triterpénique : la **glycyrrhizine**. (LECLERC - 1965 ; BOUQUET & DEBRAY - 1974 ; ANKINLOYE & ANDALUMO - 1980 ; PERRY - 1980 ; GRENAND *et al.* - 1987)

En outre, les différentes parties de la plante entrent dans des préparations traditionnelles hémostatiques et cicatrisantes (KERHARO & ADAM -1974), calmantes des douleurs gastro-intestinales (BOUQUET & DEBRAY - 1974), antidysentériques (PERRY - 1980), abortives (WATT & BREYER-BRANDWIJK - 1962).

Les graines d'*Abrus precatorius* sont surtout connues et employées pour leur très grande toxicité. Ces dernières renferment une toxalbumine, l'Abrin, aux propriétés hématoagglutinantes foudroyantes. (RIAZ *et al.* - 1972, CHONKEL - 1985)

Cette activité en fait un poison redoutable, largement utilisé dans les pratiques rituelles et comme poison de chasse. En effet, chez l'animal, la dose létale par voie sous cutanée est de 1 mg.kg⁻¹ ; chez l'homme, elle est inférieure à 0,5 mg.kg⁻¹. (KINGSBURY - 1964 ; KERHARO & ADAM - 1974).

L'abrin possède une activité antitumorale utilisée dans la lutte contre les maladies oculaires (conjonctivite granuleuse et trachome), mais aussi les ulcères et les maladies de peau (MILHET *et al.* - 1978).

WEI (1973) a purifié et caractérisé (cristallisation, rayons X) l'abrine extraite de graines d'*Abrus*. Cette protéine toxique agit en inhibant la protéosynthèse, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Ce composé cytotoxique pourrait donc être utilisé dans une thérapie anticancéreuse (WEI - 1973 ; LORD - 1987).

L'Abrin extraite des graines d' *Abrus precatorius* (A.P.A. ou *Abrus precatorius* Agglutinin) est commercialisée (SIGMA Ref. n° : L 9157). Elle est largement utilisée comme substance de référence dans des études sur les lectines végétales. (ABSAR & FUNATSU - 1984).

Nota : La confusion est souvent faite entre les deux composés : Abrin (toxalbumine = ensemble de deux toxines protéiques : Abrin A et C) et Abrine (alcaloïde : N-Méthyl-L-Tryptophane) présents tous deux dans les graines d'Abrus. La confusion est d'autant plus aisée que les deux termes présentent la même traduction française.

Outre les lectines, divers composés ont été extraits et identifiés dans les graines, il s'agit de : stérols (SIDDIQUI *et al.* - 1978) ; alcaloïdes (GHOSAL & DUTTA - 1971 ; SUBRAMANIAN *et al.* - 1973 ; WU & CHEN - 1974 ; MANDAVA *et al.* - 1974) ; flavonoïdes (LUPI *et al.* -1979 ; BHARDWAJ *et al.* - 1980)...

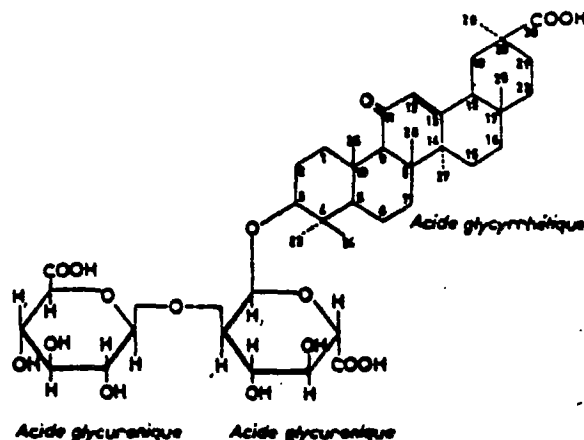
3) La glycyrrhizine :

a) Structure & propriétés :

La glycyrrhizine est extraite, principalement, de la racine de Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.) pour ses propriétés aromatiques et édulcorantes : elle offre un pouvoir sucrant de 50 à 60 fois celui du saccharose.

La glycyrrhizine (ou acide glycyrrhizique) est une saponine triterpénique de

formule brute : $C_{42}H_{62}O_{16}$. La forme saponine (glycosylée) libère par hydrolyse la sapogénine aglycone (acide 18-glycyrrhétinique majoritairement sous forme α) et deux molécules d'acide glycuronique. La forme native dans la plante est un sel de calcium ou de potassium de l'acide glycyrrhizique (glycyrrhizates).



b) Problèmes de détection chez *Abrus precatorius*: (Voir annexe)

La détection et le dosage éventuels de glycyrrhizine dans les feuilles d'*Abrus*, aussi bien que sur le matériel issu de cultures *in vitro*, ont été réalisés par C. NEF, P. TROUSLOT & H. CHRESTIN dans notre Laboratoire. Les résultats obtenus par cette équipe font l'objet d'un addendum présenté en Annexe.

4) Origine du matériel végétal utilisé :

Le matériel végétal utilisé provient de prospections effectuées en Côte d'Ivoire depuis 1984 par M.F. TROUSLOT, puis Isabelle & Thierry HARDY. Il a été ensuite entretenu et multiplié sur les parcelles expérimentales du centre ORSTOM d'Adiopodoumé. Une collection de semences et de plantes cultivées au champ a ainsi pu être mise en place. (HARDY-CLARIS - 1988).

Dans ce travail, nous avons utilisé deux lignées cellulaires d'*Abrus* hétérotrophes ou mixotrophes toutes deux, d'origines différentes, cotées 2T et 6H.

CODE	ORIGINE	CONSERVATION	ORGANE
2T	Paléoula (Région de la Forêt de Taï). Côte d'Ivoire Zone forestière humide. Prospection M.F. TROUSLOT Novembre 1984 Collecte de jeunes plantes	Plantes repiquées et entretenues en parcelles expérimentales. Centre ORSTOM d'Adiopodoumé. Récolte & collection des graines.	Tige
6H	Gahably (Région de la Forêt de Taï). Côte d'Ivoire Zone forestière humide Prospection T. HARDY Février 1985 Collecte de graines	Stock de graines et germplasm entretenu en parcelles. Centre ORSTOM d'Adiopodoumé	Hypocotyle

B) LA CULTURE *IN VITRO* :

L'obtention et l'entretien des lignées cellulaires en cultures statiques (cals) ou en milieu liquide (suspensions cellulaires) ont été réalisés en étroite collaboration avec Isabelle HARDY-CLARIS. La plupart des techniques employées ont été précédemment décrites (HARDY-CLARIS -1988)

1) Etablissement des cultures statiques :

a) désinfection du matériel végétal :

Les graines d'*Abrus precatorius* sont désinfectées par un trempage de 30 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 7% (ou d'eau de Javel commerciale à 2,3% de chlore actif), additionnée de quelques gouttes de Tween 80. Le matériel est ensuite rincé trois fois à l'eau stérile.

Afin de faciliter leur imbibition, les graines sont scarifiées par incision du tégument au scalpel. Elles sont ensuite placées sur un pont de papier filtre, dans un tube à essai (24 x 200 mm) contenant 10 ml d'eau stérile.

Les graines ainsi scarifiées germent en 48 heures. Les jeunes plantules stériles ainsi obtenues au bout de 10 à 12 jours de culture serviront d'implants pour l'initiation des cals primaires. (*Planche n°1*)

A partir de ces germinations stériles, une vitrothèque d'*Abrus* est mise en place, sous forme de microboutures. Le germplasm *in vitro* est entretenu par microbouturage d'entrenoeds sur un milieu simple : une solution minérale de KNOP diluée de moitié, à 8g.l⁻¹ de gélose, sans apport de phytohormones. On obtient ainsi des microboutures parfaitement enracinées, sans callogénèse à la base de l'explant, et présentant un développement satisfaisant de la tige et de l'appareil aérien (*Planche n° 1; photographie n° 4*). Les microboutures sont ainsi repiquées tous les mois environ.

Le matériel provenant du champ est désinfecté comme suit: des portions de tiges feuillées d'environ 10 cm sont prélevées sur les plantes cultivées sur les parcelles expérimentales. Les extrémités sectionnées sont enduites de parafine, et l'ensemble est désinfecté comme précédemment.

b) Paramètres physiques :

La germination des graines et l'entretien des cals photomixotrophes s'effectue dans les conditions suivantes :

- photopériode : 16h/24h de lumière.
- température : 28 +/- 2°C.
- éclairément : densité superficielle du flux 120 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (40W.m⁻²)
(l'éclairément est assuré par un mélange de tubes fluorescents de marque *Sylvania*: 50% Cool-White + 50% GroLux)

Les caractéristiques physiques des sources lumineuses utilisées sont déterminées à l'aide d'un appareil LICOR (Li-185A) équipé d'un détecteur de type 190S ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Les cals hétérotrophes sont maintenus à l'obscurité dans les mêmes conditions

TABLEAU N° 5
COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE

MACROELEMENTS:	mg.l ⁻¹	mM
NH ₄ NO ₃	1 650	20,61
KNO ₃	1 900	18,79
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	3,00
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	1,50
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MICROELEMENTS:	mg.l ⁻¹	μM
H ₃ BO ₃	10,00	160,00
MnSO ₄ , 4H ₂ O	25,00	110,00
ou MnSO ₄ , H ₂ O	18,96	110,00
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10,00	34,80
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25	1,00
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	0,100
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025	0,114
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,80	100,00
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	37,25	100,00
COMPOSES ORGANIQUES:	mg.l ⁻¹	μM
Glycine	2,00	44,40
Myoinositol	100,00	550,00
Acide nicotinique	5,00	40,60
Pyridoxine HCl	0,50	2,40
Thiamine HCl	0,50	1,50
Biotine	0,05	0,20
Acide folique	0,50	1,10
Glutamine	200,00	1360,00

de température.

c) Ensemencement primitif : initiation des cals de prolifération :

Des fragments d'hypocotyle ou de tiges issus de germinations stériles sont mis en culture dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant environ 40 ml de milieu solidifié. On réalise ainsi un semencement à partir de fragments cylindriques de quelques centimètres de longueur.

Au début de cette étude, le seul matériel alors disponible était un plant d'*Abrus* cultivé au champ (souche 2). Le traitement à l'hypochlorite provoquait une dépigmentation irréversible des feuilles prélevées sur ce matériel. Les premiers cals initiés le furent donc à partir de tiges (lignée 2T). Par la suite, l'obtention de germinations stériles a pu être possible, et nous a conduit à induire des cals à partir d'hypocotyle (lignée 6H). L'initiation de cals à partir de feuilles s'est avérée très délicate, compte tenu de la très petite taille des folioles prélevés sur les microboutures (flétrissement rapide et nécroses à la mise en culture *in vitro*).

Le milieu d'initiation et d'entretien des cals contient :

- les macroéléments de MURASHIGE & SKOOG (1962)
- les microéléments de NITSCH (NITSCH *et al.* - 1968)
- les composés organiques et les vitamines de NITSCH (NITSCH *et al.* - 1968) additionnés de glutamine.

La composition du milieu est donnée dans le tableau n° 5.

On rajoute à ce milieu de base :

- phytohormones (A.N.A. et B.A.P. à 1 mg. l⁻¹)
- agar à 8 g. l⁻¹
- saccharose en teneurs variable suivant la nature de la culture (15 ou 30 g.l⁻¹).

Nous avons adopté une balance hormonale A.N.A./B.A.P. = 1/1 (mg. l⁻¹) à partir des résultats obtenus sur des cultures photomixotrophes de *Citrus scoparius* (SATO *et al.* - 1981) et d'*Euphorbia characias* (HARDY *et al.* - 1987).

Ce mélange hormonal nous a permis d'obtenir très rapidement des cals de prolifération chlorophylliens et friables, homogènes et sans zones de nécroses anormales. (HARDY-CLARIS - 1988)

Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant l'autoclavage à l'aide de solutions d'HCl ou de KOH. La stérilisation des milieux s'effectue à l'autoclave pendant 30 minutes à 116°C.

d) Entretien des lignées statiques :

L'initiation des cals est réalisée sur le milieu précédemment décrit, contenant 30 g.l⁻¹ de saccharose. Les premières différenciations sont visibles au bout d'une semaine, et le premier repiquage s'effectue une semaine plus tard (donc après 2 semaines de culture).

Une sélection visuelle est effectuée pour ne retenir que les cals les plus chlorophylliens et les plus friables. (Planche n° 2; photographie n° 1)

Les cals sont ensuite repiqués régulièrement toutes les 3 semaines sur le même

milieu, contenant 15 g.l^{-1} de saccharose, afin de favoriser le verdissement.

Les cultures en boîtes de Petri ont été rapidement abandonnées au profit de fioles d'Erlenmeyers de 300 ml contenant 80 ml de milieu, obturés par des bouchons de silicone haute performance (VERSILIC : Fabrication Verneret - France).

En effet, ce type de flaconnage nous a permis à la fois d'obtenir une biomasse de cals importante (indispensable à la mise au point des différents dosages enzymatiques) et de résoudre en partie les problèmes de condensation de vapeur d'eau à la surface des contenants.

Par souci d'homogénéité entre les souches, les lignées hétérotrophes strictes 6H ont été obtenues par passage à l'obscurité, sur un milieu à 30 g.l^{-1} de saccharose, de cals photomixotrophes. Elles sont entretenues en boîtes de Petri (on ne rencontre pas de condensation à l'obscurité) et repiquées toutes les 3 à 5 semaines. Ce matériel hétérotrophe est beaucoup moins exigeant que les lignées photomixotrophes en ce qui concerne les délais de repiquage : un cal âgé de cinq semaines peut être utilisé avec succès comme inoculum.

2) Passage en suspension et cultures en fioles d'Erlenmeyer :

Pour l'obtention de lignées photomixotrophes, le passage en suspension est réalisé à partir de cals friables et chlorophylliens. Plusieurs cals (correspondant à environ 10g de matière fraîche) sont légèrement écrasés à la spatule dans une boîte de Petri stérile, puis transférés dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu liquide. (Ce milieu est de même composition organominérale que le milieu gélosé employé pour les cultures statiques). Les premiers repiquages sont réalisés après trois semaines par dilution de moitié avec du milieu neuf de la "suspension" grossière ainsi obtenue.

Les macrocals encore présents dans la culture sont éliminés dans un premier temps à l'aide d'une spatule, puis la suspension est filtrée stérilement à intervalles réguliers (tous les 3 repiquages environ) sur une toile à bluter en Nylon de 1 mm de maille intérieure (Blutex - Fab. : Tripette & Renaud).

Les conditions optimales de culture ont été mises au point sur notre matériel par I. HARDY-CLARIS (1988) :

- **densité d'inoculum** : Une densité cellulaire initiale de 12% (Volume sédimenté) a été retenue. Elle allie les avantages d'une bonne reprise de croissance au repiquage, et d'une biomasse finale satisfaisante.

- **rapport Fe/EDTA** : D'après DALTON et ses collaborateurs (1983), la présence d'un précipité, vraisemblablement de phosphate de Fer, dans les milieux de base minérale MURASHIGE & SKOOG doit être imputée à une chélation imparfaite du Fer. HARDY-CLARIS (1988) a donc modifié le rapport EDTA/Fer en le multipliant par trois. Le précipité a pu ainsi être éliminé, mais aucun effet significatif n'a été noté sur la chlorophyllogénèse et la biomasse finale des suspensions cellulaires, suggérant une utilisation par les cellules des formes minérales précipitées.

- **concentration en saccharose** : Les suspensions photomixotrophes d'*Abrus precatorius* sont repiquées régulièrement sur un milieu à 15 g.l^{-1} (44 mM). En effet, dans les conditions de culture retenues, une teneur inférieure en saccharose conduit, au fil des repiquages, à une diminution progressive de la chlorophyllogénèse. La teneur en saccharose retenue permet un accroissement en biomasse optimal.

- **intervalle de repiquage** : Un intervalle optimal de repiquage de 14 jours a été déterminé, afin de maintenir la population cellulaire en conditions de photomixotrophie. Un taux en chlorophylle important ($>10 \text{ mg.l}^{-1}$ de culture) est ainsi maintenu au cours de l'entretien de la lignée. D'autre part, dans ces conditions, la reprise de croissance au repiquage s'effectue sans temps de latence.

Les fioles d'Erlenmeyer sont placées dans un agitateur orbital thermostaté et éclairé (modèle GALLENGAMP) avec une température constante de 28°C et une photopériode de 18 heures. (Planche n° 2; photographie n°2)

Un éclairage d'environ 20W.m^{-2} ($100 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) est assurée par un mélange de tubes "Cool-white" (50%) et "Gro-Lux" (50%) (Sylvania). L'agitation orbitale s'effectue par une plaque Gallenkamp à rotation excentrée tournant à 80 r.p.m.

Les suspensions cellulaires hétérotrophes sont initiées à partir des cals hétérotrophes. Elles sont entretenues sur une table d'agitation orbitale horizontale (modèle Biolafitte) placée dans une chambre thermostatée à $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les repiquages ont lieu tous les 12 jours, dans un milieu à 30 g.l^{-1} de saccharose, avec une densité d'inoculum de 11% (Volume Sédimenté). Les lignées hétérotrophes sont cultivées dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 ml, obturés par un bouchon en coton et une feuille de papier aluminium.

Nota : Il est important de préciser que le matériel hétérotrophe ainsi obtenu peut à tout moment être réversé en le plaçant dans des conditions d'éclairage suffisantes. Ce cas de figure est donc totalement différent de celui de mutants albinos chimiquement induits (NATO et al. -1984) ou de mutants dépigmentés spontanés à la lumière que nous avons pu obtenir au laboratoire sur des cals de Catharanthus roseus (C. NEF- Communication personnelle).

3) Cultures en réacteurs :

a)Description du matériel : (Figures n° 9 & 10; photographies n° 3 & 4, planche n° 2)

Le réacteur utilisé est un incubateur à cultures cellulaires de marque Biolafitte (modèle ICC2) à agitation mécanique, d'un volume total de 2,2 litres (capacité utile : 1,7 litres). Il comprend une cuve en verre borosilicaté de 110 mm de diamètre, à double enveloppe, fond hémisphérique, et fermée hermétiquement par une platine en acier inoxydable.

La présence, sur la platine, de nombreux orifices permet l'introduction et la fixation sur le corps de réacteur d'une électrode à pH stérilisable (INGOLD), d'une électrode de mesure du potentiel d'oxydoréduction stérilisable (INGOLD), ainsi qu'une sonde ampérométrique (INGOLD) ou une sonde potentiométrique (BIOLAFITTE) pour la mesure de l'oxygène dissous. Ces sondes, fixées sur la platine métallique, sont reliées au boîtier central d'alimentation et de contrôle BIOLAFITTE. (Figure n°10)

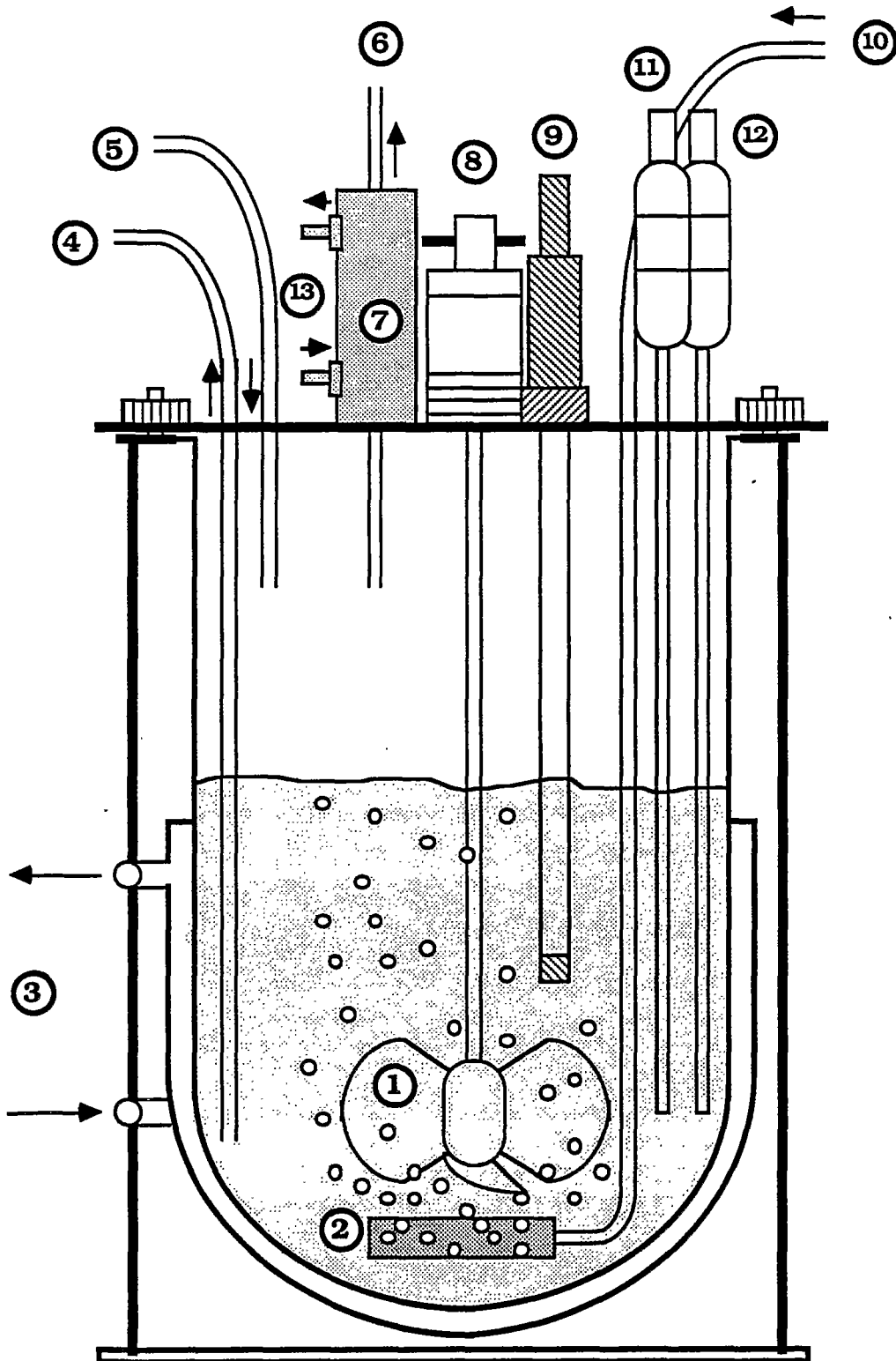
Une turbine à pales, adaptée aux cellules végétales, assure l'agitation de la suspension. Son profil, en hélice, permet de limiter les contraintes de cisaillement, et d'éviter ainsi une lyse cellulaire trop importante. (Figure n° : 9)

La régulation thermique (27°C) de l'ensemble est assurée par une circulation permanente d'eau thermostatée dans la double enveloppe.

Un diffuseur en acier inoxydable assure l'apport, du mélange gazeux, précédemment filtré sur un filtre à membrane Millipore (pores de $0,20 \mu\text{m}$).

Figure n° 9 :

SCHEMA DU BIORÉACTEUR UTILISÉ: BIOLAFITTE ICC2



- 1: Turbine d'agitation à trois pales
- 2: Diffuseur de mélange gazeux
- 3: Circuit d'eau thermostatée (28°C)
- 4: Conduit de prélèvement
- 5: Conduit d'entrée de milieu
- 6: Conduit de sortie de mélange gazeux

- 7: Condenseur
- 8: Axe d'agitation à vitesse variable
- 9: Sonde de mesure de l'oxygène dissous
- 10: Conduit d'entrée du mélange gazeux
- 11: Electrode de mesure du pH
- 12: Electrode de mesure du rh
- 13: Circuit d'eau réfrigérée (5°C)

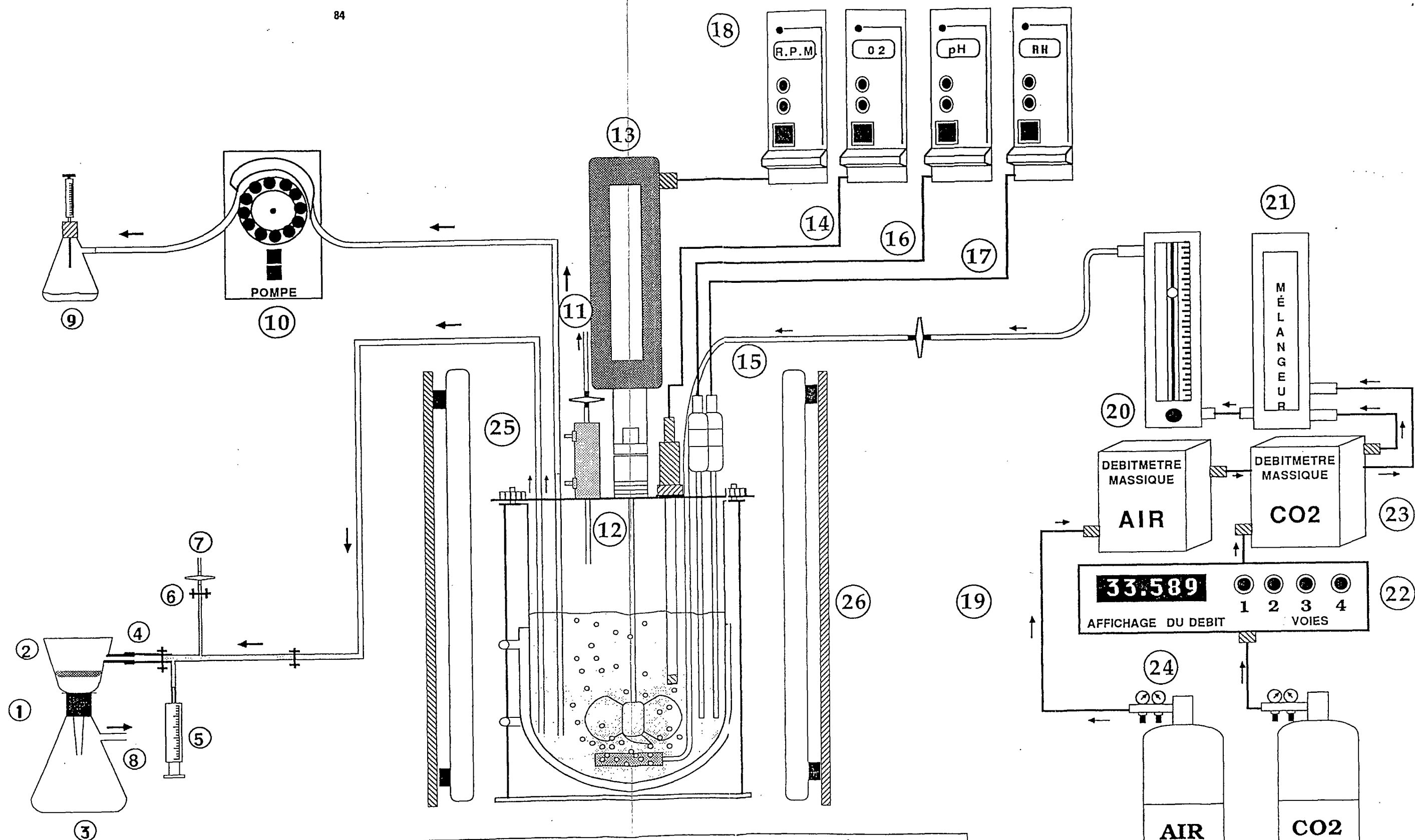


Figure n° 10 : SCHÉMA D'ENSEMBLE DES SYSTEMES DE CONTROLE ET DE PRÉLEVEMENT

- | | |
|--|--|
| 1 : Système de prélèvement rapide sous azote liquide | 14 : Circuit de mesure de l'oxygène dissous |
| 2 : Entonnoir à verre fritté n°2 | 15 : Entrée du mélange gazeux |
| 3 : Fiole à vide pour la récupération du milieu | 16 : Circuit de mesure du pH |
| 4 : Raccords rodés (remplacement du fritté) | 17 : Circuit de mesure du potentiel d'oxydoréduction |
| 5 : Réserve d'alcool | 18 : Modules Biolafitte de contrôle et de régulation |
| 6 : Pince de Mohr | 19 : Contrôle de l'alimentation en mélange gazeux |
| 7 : Prise d'air | 20 : Débitmètre à bille |
| 8 : Sortie vers trompe à vide | 21 : Mélangeur |
| 9 : Système de micro-prélèvement de milieu | 22 : Débitmètre/régulateur massique |
| 10 : Pompe péristaltique | 23 : Détecteurs O ₂ /CO ₂ du débitmètre massique |
| 11 : Sortie du mélange gazeux | 24 : Manomètre/étendeur |
| 12 : Condenseur | 25 : Cuve de réacteur |
| 13 : Moteur du système d'agitation | 26 : Système circulaire d'éclairage (en coupe) |

La composition du mélange gazeux est contrôlée en amont du réacteur par un débitmètre massique de marque BROOKS. En sortie de cuve, le mélange est filtré sur membrane Millipore de 0,20 μm . Le débit de sortie est régulièrement contrôlé à l'aide d'un débitmètre à bille de marque BROOKS.

L'aération est ajustée à 0,1 vvh de mélange gazeux.

Un condenseur alimenté en eau refroidie (5°C), placé en sortie de mélange gazeux limite l'évaporation du milieu de culture provoquée par le bullage d'air sec.

Un dispositif d'éclairage circulaire entoure le réacteur. Il est composé de tubes fluorescents (SYLVANIA Cool-White 50% et Gro Lux 50%) qui entourent le réacteur. Le flux lumineux résultant et arrivant au centre de la cuve est de 110 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (environ 25 W.m^{-2}). La photopériode (18h) est commandée par une horloge électrique.

b) Techniques de prélèvement : (voir la figure n° 10)

Nous avons mis au point deux systèmes différents de prélèvement *in situ* de la suspension :

- Un système de mini-prélèvement permettant de soutirer du réacteur un volume réduit de milieu de culture en modifiant le moins possible le volume total. Environ 10 ml de milieu sont ainsi prélevés pour analyses organominérales.

- En outre, l'étude cinétique de l'évolution des activités enzymatiques nous a conduit à mettre au point un système de prélèvement assurant une fixation instantanée des cellules dans l'azote liquide. Un tube plongeant dans la cuve permet, par surpression interne, de prélever environ 50 ml de suspension, qui sont immédiatement filtrés sous vide sur un entonnoir équipé d'un verre fritté n°2. Les cellules essorées sont immédiatement fixées dans l'azote liquide.

c) Mise en oeuvre d'une culture en bioréacteur :

Le réacteur contenant de l'eau bidistillée et équipé de ses sondes est autoclavé à 116°C pendant 45 minutes. On stérilise l'ensemble une deuxième fois durant 30 minutes, la cuve étant remplie de milieu de culture. Après refroidissement, la sonde à oxygène est étalonnée, puis on contrôle la stérilité du milieu pendant 24 heures.

L'ensemencement est réalisé à l'aide d'un inoculum homogène constitué de suspensions cellulaires de la lignée 6H en phase stationnaire de croissance (14 jours).

Les prélèvements sont effectués à intervalles réguliers dans le réacteur par surpression. Ils permettent de suivre l'évolution de la biomasse ainsi que certains paramètres biochimiques et physiologiques de la culture.

La densité d'inoculation du réacteur est celle des cultures en fioles d'Erlenmeyer (10 à 12 % . V.S.)

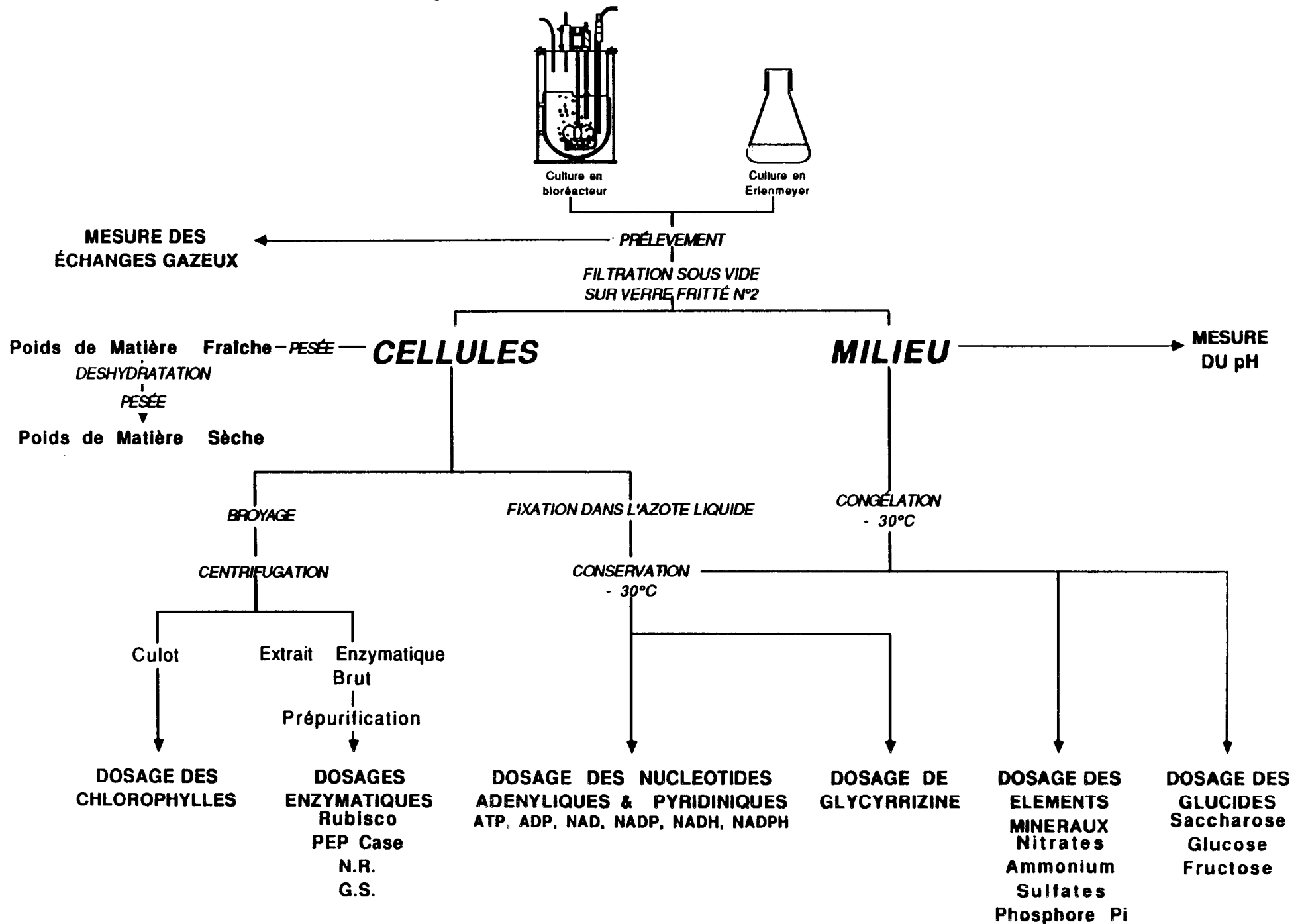
C) METHODES ANALYTIQUES :

La figure n° 11 montre les protocoles de prélèvements et d'analyse employés en commun avec I. HARDY-CLARIS (1988)

1) Estimations de la biomasse :

La biomasse présente dans la suspension est estimée suivant trois paramètres :

Figure n° 11 : PROTOCOLE DE TRAITEMENT DES PRÉLEVEMENTS



- Le Poids de Matière Fraîche (P.M.F.) est mesuré après filtration sous vide partiel, pendant 30 secondes, d'un volume donné de suspension sur un verre fritté n°2.

- Le Poids de Matière Sèche (P.M.S.) est déterminé à partir de 500 mg de matière fraîche, mis à sécher dans une étuve à 80°C durant 48 heures, ou 15 minutes dans un four à micro-ondes (TOSHIBA- 500 Watts)

- Mesure du volume cellulaire sédimenté (V.S.) : Un volume connu de suspension cellulaire est mis à décanter durant 20 minutes dans une éprouvette graduée. On note ensuite le rapport en pourcentage du volume de cellules sédimentées sur le volume total. Cette mesure peut également être réalisée dans la cuve même du réacteur.

Le temps de doublement Td (ou Temps de génération : Tg) est estimé, durant la phase exponentielle de croissance, comme suit :

Au cours de cette phase de croissance, la biomasse cellulaire évolue suivant une fonction exponentielle du temps, donc :

$$B_t = B_0 e^{\mu t} \quad \text{où :} \quad \begin{array}{l} \mu = \text{taux de croissance en jours}^{-1} \\ B_0 = \text{biomasse au temps } 0 \\ B_t = \text{biomasse au temps } t \\ t = \text{temps en jours} \end{array}$$

Si B_1 et B_2 sont deux valeurs de la biomasse cellulaire respectivement aux temps t_1 et t_2 pris dans la phase exponentielle, alors :

$$\mu = \frac{\log B_2 - \log B_1}{t_2 - t_1}$$

Le temps de doublement de la culture s'exprime alors par :

$$T_d = \frac{\log 2}{\mu}$$

2) Dosage des sucres :

Les glucides intracellulaires et dans le milieu de culture sont dosés par la méthode enzymatique décrite par BERNT & BERGMAYER (1974).

Le mode opératoire a été adapté par HARDY-CLARIS (1988) à partir des résultats de REBEILLE-BORGELLA (1983). Cette méthode enzymatique, sensible et très spécifique, a été employée pour déterminer les teneurs en saccharose, fructose et glucose libres intracellulaires et dans le milieu de culture.

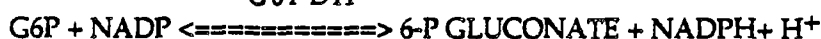
Principe de la méthode : On catalyse par des enzymes spécifiques du produit à doser la formation ou la disparition dans des proportions stoechiométriques, d'une molécule à haut coefficient d'absorption molaire. Pour le dosage des glucides, il s'agit du NADH ou du NADPH, dont l'absorption est maximale à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le glucose et le fructose sont phosphorylés en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate par l'hexokinase (HK : EC 2.7.1.1.).



Hexokinase

En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-P DH : EC 1.1.1.49.), le 6-phosphogluconate formé est mesuré par l'augmentation de la densité optique à 340 nm, due à la production conjointe de NADH. La stoechiométrie de la réaction (1 NADH produit par 6-phosphogluconate formé) permet de déterminer la concentration en glucose.

G6PDH

L'addition de phosphoglucosomérase (PGI : EC 5.3.1.9.) transforme le F-6-P en G-6-P qui réagit comme précédemment: la variation de densité optique à 340 nm donne cette fois la concentration en glucose + fructose de l'échantillon.

PGI

Enfin, la teneur en saccharose est mesurée par la différence des teneurs en glucose avant et après l'hydrolyse enzymatique par action de la β -Fructosidase (EC : 3.2.1.26).

 β -Fructosidase

Les dosages spectrophotométriques sont réalisés sur un spectrophotomètre de marque BAUSH & LOMB (type : Spectronic 2 000).

Les sucres intracellulaires sont dosés comme suit :

Les cellules (150 mg de matière fraîche) sont essorées et fixées dans 3 ml de NaOH 0,5N (Le saccharose est instable en milieu acide). Les échantillons sont homogénéisés dans un broyeur de Potter, avant d'être neutralisés par HCl. Ils sont ensuite centrifugés à 27 000 g durant 15 minutes, afin d'éliminer les débris cellulaires. (Centrifugeuse SORVALL RC5B. Dupont Instruments).

3) Dosage des principaux macroéléments :

Nous avons mis au point et adapté aux microéchantillons des méthodes de dosage spectrophotométriques des éléments minéraux utilisés pour l'analyse des eaux naturelles. La plupart de ces méthodes sont utilisées dans les chaînes d'analyse automatique de type TECHNICON.

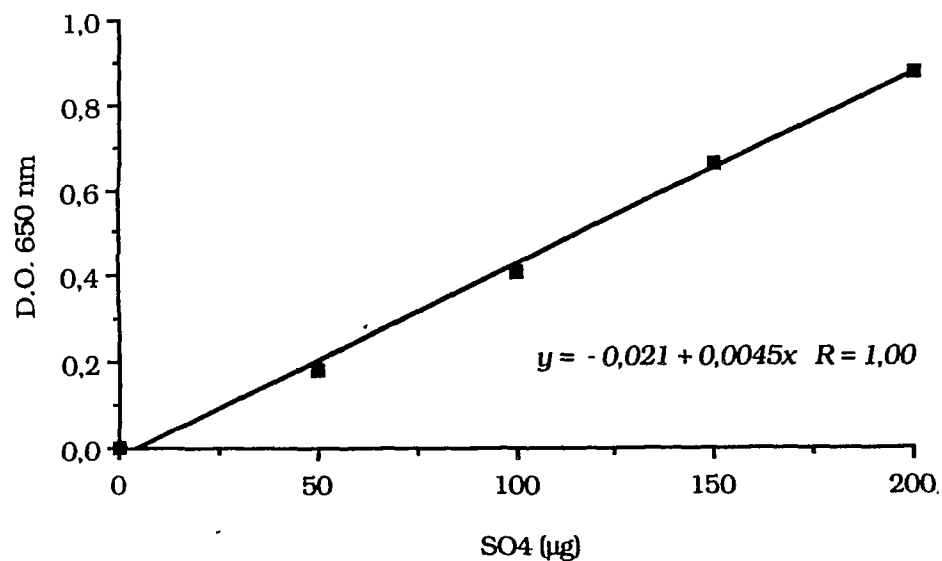
Le protocole expérimental détaillé de chaque méthode est donné en Annexe.

L'ensemble de ces méthodes présente les avantages d'une excellente sensibilité, d'une grande facilité de mise en oeuvre, et ne nécessitent qu'un appareillage simple et peu coûteux.

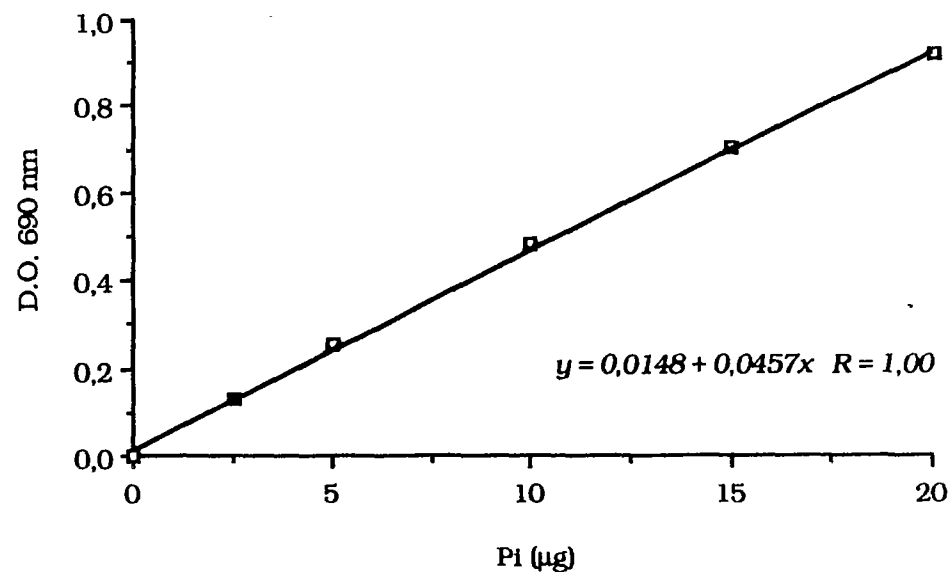
La linéarité de chaque méthode une fois adaptée aux micro dosages a été vérifiée. Les droites d'étalonnage sont présentées sur la figure n° 12.

Le Laboratoire de Physiologie Végétale de l'U.S.T.L. Montpellier a récemment mis au point une méthode d'analyse par HPLC échangeuse d'ions en détection ultra-violette, pour le dosage des ions minéraux dans les sèves xylémiques (SARROBERT et al. - 1989).

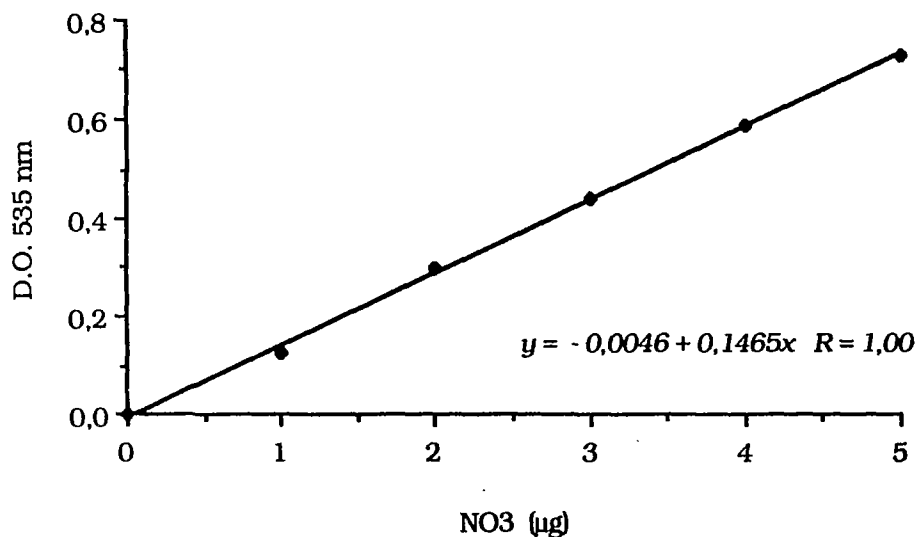
(A) DOSAGE NEPHELOMETRIQUE DES IONS SULFATES



(B) DOSAGE COLORIMETRIQUE DU PHOSPHORE



(C) DOSAGE COLORIMETRIQUE DES IONS NITRATE



(D) DOSAGE COLORIMETRIQUE DES IONS AMMONIUM

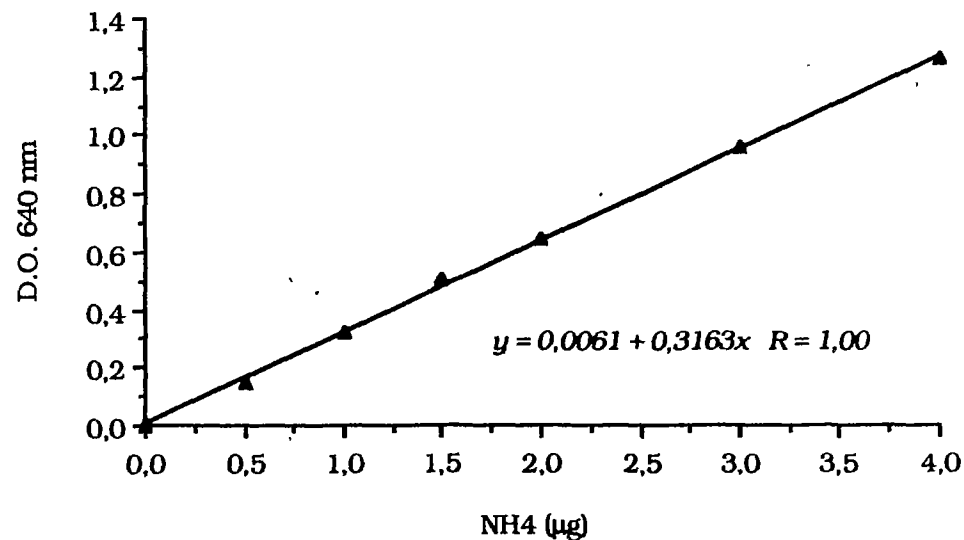


Figure n° 12 : Courbes-étalons pour les méthodes de dosage spectrophotométriques des composés minéraux

Cette méthode fournit des résultats comparables aux méthodes colorimétriques ou d'absorption atomique. Elle offre de plus l'avantage de présenter sur un même chromatogramme le bilan ionique complet d'une solution (cations ou anions suivant la nature de la colonne échangeuse). La transposition d'une telle méthode à l'analyse des milieux nutritifs semble riche d'intérêt, mais elle impliquerait une adaptation aux caractéristiques spécifiques de ces milieux (hautes teneurs en composés minéraux, complexité du mélange organominéral à analyser), et la disponibilité et la maintenance sur site d'un appareillage relativement sophistiqué.

Enfin, les limites de détection atteintes par HPLC restent du même ordre que celles obtenues avec les méthodes colorimétriques que nous avons utilisées.

Les dosages de minéraux intracellulaires sont effectués comme suit : Un gramme (PMF) environ de cellules sont broyées au polytron dans 1 ml de tampon Tris-HCl 100 mM (pH = 7,5). L'homogénat est ensuite centrifugé à 27 000g durant 30 minutes. Les éléments minéraux sont dosés dans le surnageant comme pour les milieux de culture.

Nota : La composition des tampons et réactifs est toujours présentée en Annexe :

a) Dosage des ions ammonium NH_4^+ :

Nous avons utilisé une méthode spectrophotométrique employée initialement pour les dosages d'ammonium dans les eaux naturelles. SOLORZANO (1969) et KOROLEFF (1970).

Ce dosage au bleu d'Indophénol est basé sur une réaction en deux étapes :

- L'hypochlorite, en milieu alcalin, réagit avec l'ammonium pour former une monochloramine.
- La monochloramine donne, ensuite, avec le phénol et l'hypochlorite en excès, le bleu d'indophénol, qui absorbe à 640 nm. Le nitroprussiate de sodium joue le rôle de catalyseur pour cette deuxième étape. Afin d'éviter la précipitation des ions alcalino-terreux en milieu basique, on fait agir du citrate de sodium.

Une gamme étalon de 0 à 4 μg d'ammonium a été réalisée. Nous avons obtenu une droite de régression linéaire d'équation :

$$Q = 3,893 \times D.O_{640} - 0,071 \quad (r = 0,998)$$

où Q représente la quantité d'ammonium présente dans le tube en μg .
(Fig. : 12- D)

b) Dosage des ions nitrates NO_3^- :

Nous avons adapté, pour ce dosage, la méthode de SNELL & SNELL (1949). Dans un premier temps, les nitrates sont réduits en nitrites par le sulfate d'hydrazine en présence de Cuivre. Les nitrites sont ensuite déterminés par spectrophotométrie à 535 nm, après diazotisation avec la sulfanilamide couplée avec la N1-Naphtyléthylène diamine.

Une gamme étalon de 0 à 5 μg de nitrates a permis de tracer une droite étalon d'équation :

$$Q = 4,98 \times D.O_{535} - 6,1 \cdot 10^{-3} \quad (r = 0,998)$$

où Q représente la quantité de nitrates présente dans le tube en μg .
(Fig.: 12-C)

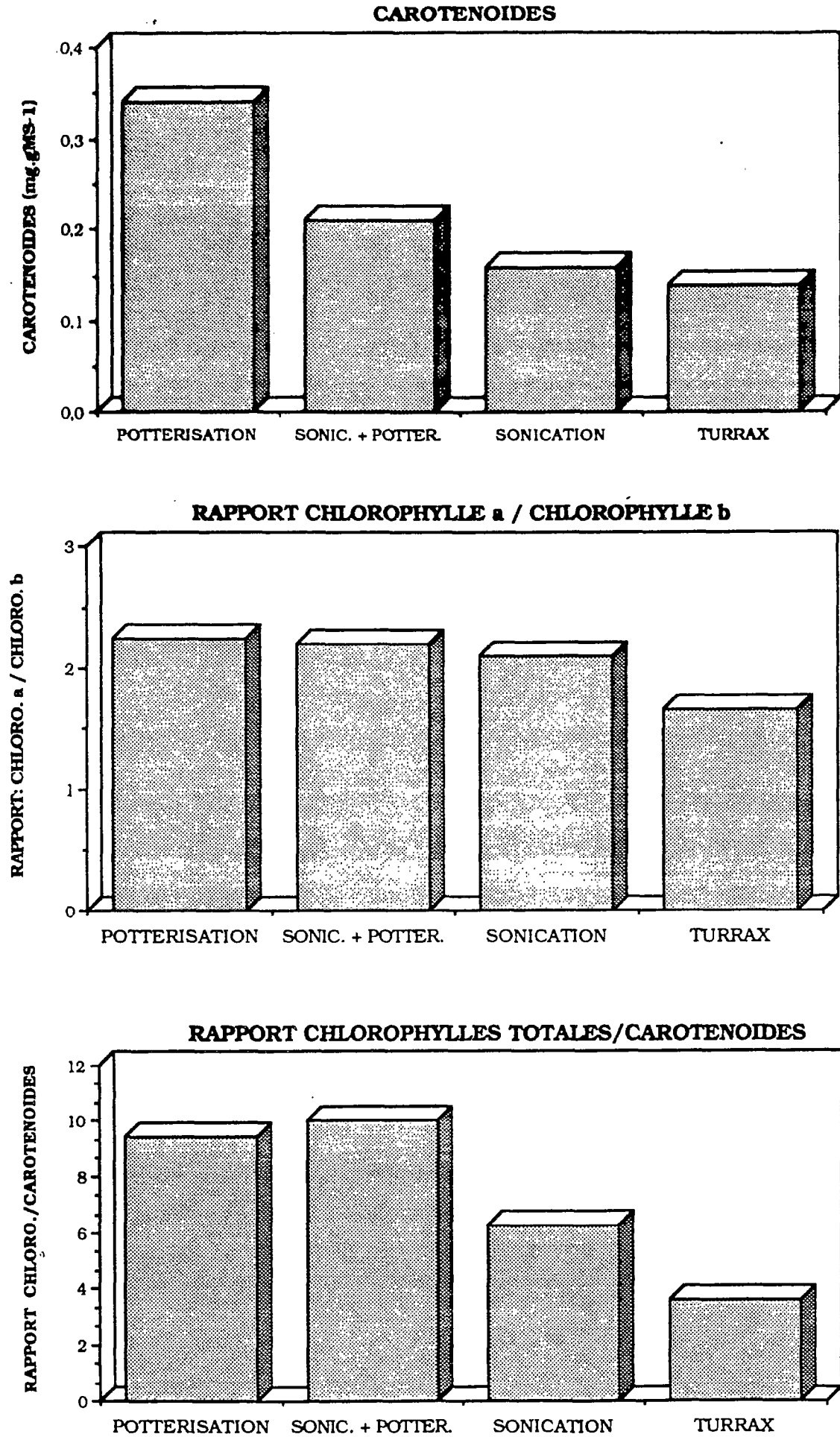


Figure n° 13 : Influence de la technique d'extraction sur le rendement en pigments : chlorophylles & caroténoïdes

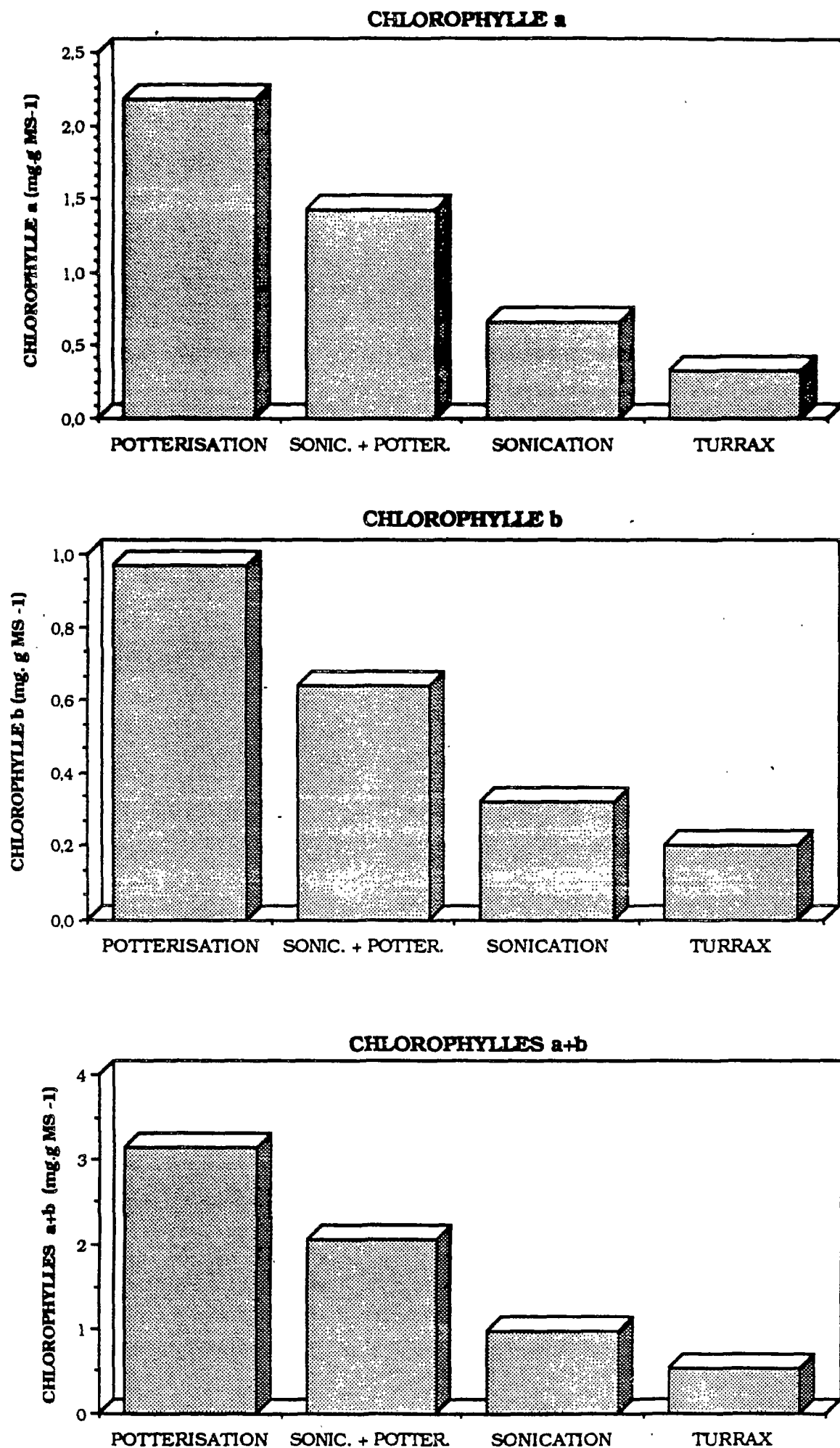


Figure n° 14 : Influence de la technique d'extraction sur le rendement en pigments chlorophylliens

c) Dosage du Phosphore inorganique Pi :

La méthode utilisée est celle de TAUSSKY & SHORR (1953), légèrement modifiée. Les ions phosphate réagissent avec le Molybdate d'ammonium en présence de FeSO_4 pour former un complexe phospho-molybdique bleu qui absorbe à 690 nm.

La gamme-étalon s'étend de 0 à 20 μg de Pi dans le tube. Elle donne une droite d'équation :

$$Q = 23,2 \times D.O_{690} - 0,18 \quad (r = 0,999)$$

où Q représente la quantité de phosphore inorganique présente dans le tube en μg . (Fig.: 12-B)

d) Dosage des ions Sulfates SO_4^{2-} :

Ce dosage par néphélométrie emprunte la méthode décrite par FROMAGEOT (1963). Les sulfates du milieu réagissent avec du BaCl_2 dissous dans une solution de détergent (Tween 20) ou de PVP soluble. Il se forme alors un précipité blanchâtre de sulfate de baryum maintenu en suspension homogène. La turbidité du milieu réactionnel est mesurée à 650 nm.

Une gamme étalon de 0 à 200 μg de SO_4^{2-} est réalisée. Elle donne une droite d'étalonnage d'équation :

$$Q = 134,90 \times D.O_{650} - 0,353 \quad (r = 0,998)$$

où Q représente la quantité de sulfates présente dans le tube en μg . (Fig. : 12-A)

e) Dosage des cations K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} :

Ces dosages ont été effectués au Laboratoire Central d'Analyses du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

Le potassium est déterminé par photométrie d'émission sur un photomètre à flamme.

Les dosages de calcium et de magnésium sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption atomique.

4) Dosage des chlorophylles totales :

a) Choix d'une technique d'extraction :

Afin de déterminer la technique optimale d'extraction des pigments chlorophylliens correspondant à notre matériel, plusieurs procédés ont été testés sur une suspension chlorophyllienne de la lignée 6H âgée de 14 jours. Les broyages sont effectués dans l'acétone à 80 %, dans la glace fondante et à l'obscurité (Mac KINNEY - 1941).

Trois extractions différentes du même matériel sont réalisées avec chacune des techniques :

- broyage des cellules dans l'acétone à 80% à l'aide d'un homogénéisateur de Potter à piston de Teflon (Thomas). Plusieurs passages sont nécessaires

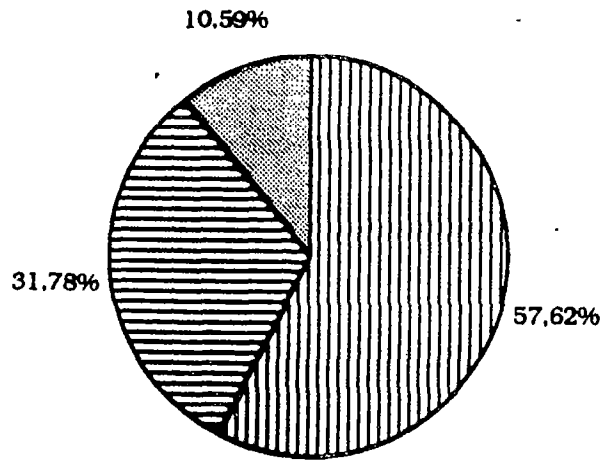
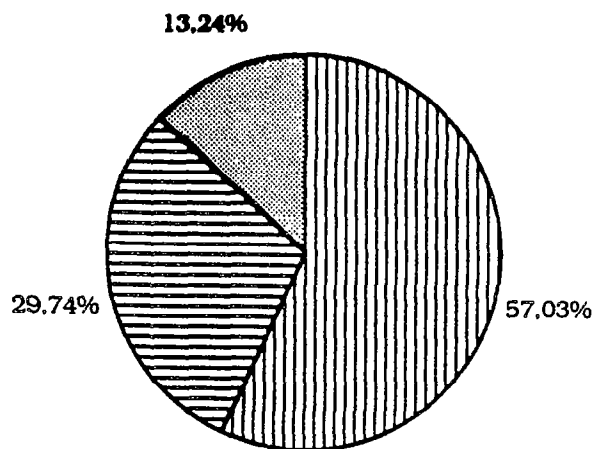
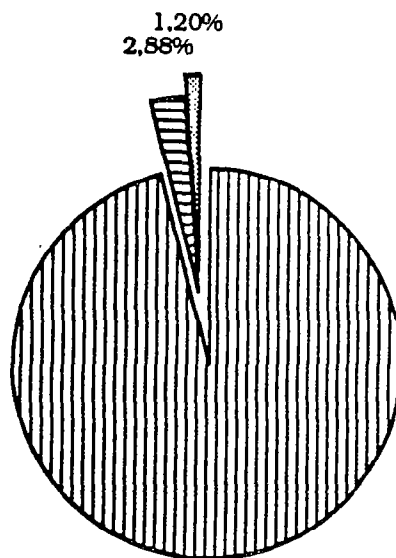
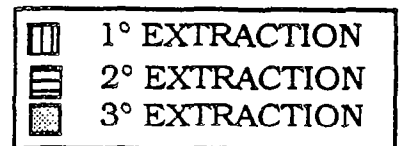
**CHLOROPHYLLE a****CHLOROPHYLLE b****CAROTENOIDES**

Figure n° 15 : Influence du nombre de cycles extraction/broyage sur le rendement d'extraction des pigments

jusqu'à décoloration complète du broyat.

- sonication du matériel dans l'acétone à 80 % à l'aide d'un appareil de type VIBRACELL (sonde de 3 mm de diamètre) durant trois minutes. Les macrocals présents dans la suspension ne sont pas dissociés, mais l'homogénéisation au potter se trouve grandement facilitée.

- broyage des cellules à l'aide d'un broyeur à couteaux de type Ultra-Turrax durant 30 secondes à 15 000 r.p.m.

Les homogénats issus des différents broyages sont ensuite centrifugés à 15 000g durant 30 minutes à 4°C. Le volume de surnageant est mesuré.

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures n° 13 & 14.

Le broyage des cellules à l'aide d'un homogénéisateur de Potter fournit les meilleurs résultats. En effet, pour l'extraction des chlorophylles totales, le rendement est multiplié respectivement par 5 par rapport au broyage à l'Ultra Turrax, par 3 par rapport à la sonication seule, et par 1,5 par rapport à la sonication suivie d'un broyage au Potter.

Le broyage à l'homogénéisateur à piston de Teflon (Potter) permet également une meilleure extraction des caroténoïdes. Qualitativement, les chlorophylles a et b conservent sensiblement le même rapport quel que soit le mode d'extraction.

Par contre, les homogénéisations au sonicateur et à l'Ultra-Turrax donnent des extraits acétoniques plus riches en caroténoïdes. Il est vraisemblable que l'élévation de température causée par ces deux procédés provoque une thermodégradation des chlorophylles.

b) Influence du nombre de cycles broyage/centrifugation :

Après avoir déterminé la méthode optimale d'extraction, il importe de connaître le nombre de cycles broyage/centrifugation nécessaires à l'extraction de la totalité des pigments.

Il apparaît nettement, au vu des résultats obtenus (figure n° : 15) que deux extractions suffisent pour solubiliser la quasi totalité des caroténoïdes et environ 85 % des chlorophylles a et b.

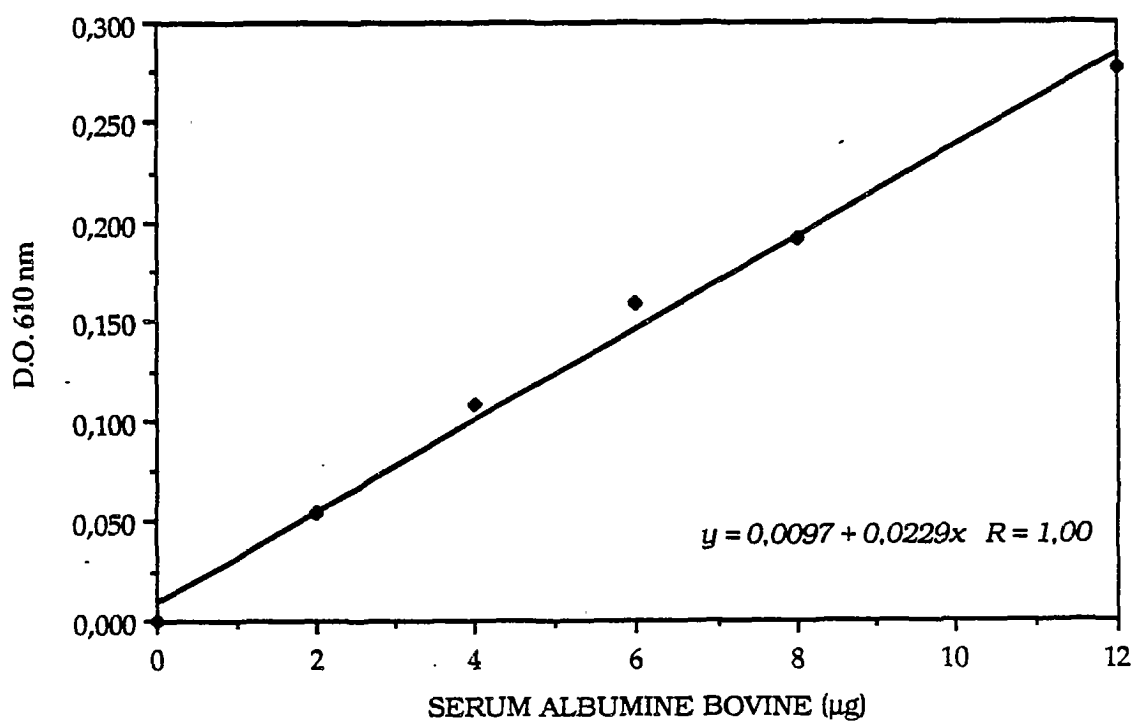
Afin de simplifier les dosages de routine, la première extraction a été remplacée par un trempage durant 15 heures des échantillons au froid (4°C) et à l'obscurité dans l'acétone 80% (Mc KINNEY - 1941). Cette extraction passive est suivie d'un broyage au Potter ; elle donne des rendements d'extraction comparables à ceux obtenus par deux broyages au Potter.

c) calcul des concentrations :

La Densité Optique des extraits acétoniques (80% v/v) est mesurée à 470 nm, 646 nm et 663 nm. Les concentrations en pigments sont calculées par rapport au poids de matière sèche, d'après les équations de LICHTENTALLER & WELLBURN (1983).

- Chlorophylles a ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'extrait) = $C_a = 12,21 \times \text{D.O.}_{663} - 2,81 \times \text{D.O.}_{646}$
- Chlorophylles b ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'extrait) = $C_b = 20,13 \times \text{D.O.}_{646} - 5,03 \times \text{D.O.}_{663}$
- Caroténoïdes totaux ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'extrait) = $\frac{1000 \times \text{D.O.}_{470} - 3,27 \times C_a - 104 C_b}{1000}$

Figure n° 16 : DOSAGE DES PROTEINES SOLUBLES
Méthode de SEDMAK & GOLDBERG . Droite-étalon



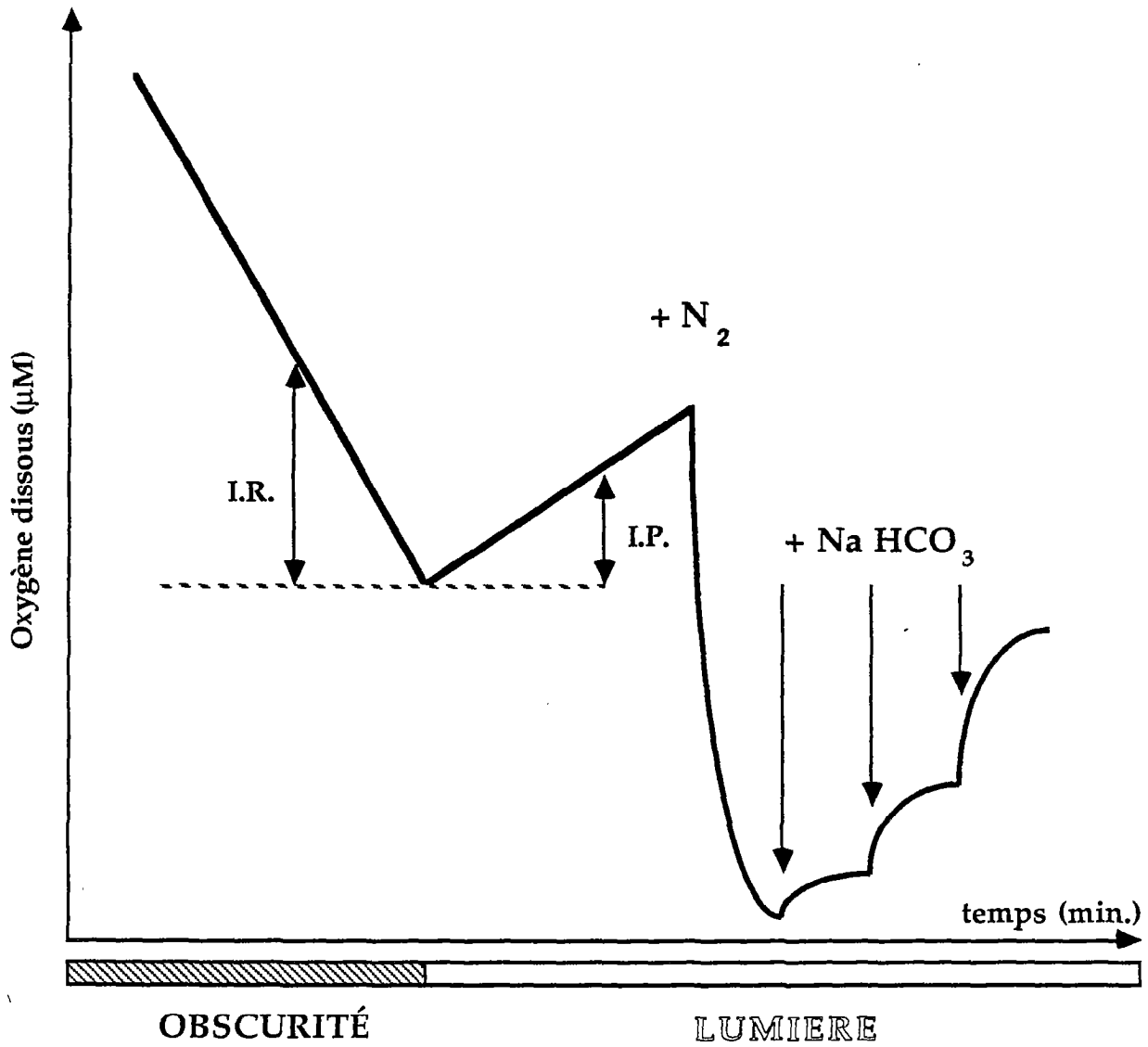


Figure n° 17 : Schéma montrant les variations de la teneur en oxygène dissous mesurées à l'électrode de Clark sur une suspension de cellules photosynthétiques. La consommation d'oxygène pendant la phase obscure permet de calculer l'intensité respiratoire des cellules (I.R.). L'évolution de l'oxygène à la lumière donne l'intensité photosynthétique nette (I.P.). Après un bref dégazage par l'azote, on peut évaluer la vitesse de production d'oxygène en ajoutant à la suspension des concentrations connues d'hydrogénocarbonate (NaH CO₃).

5) Dosage des protéines solubles :

Les protéines solubles intracellulaires sont dosées dans les extraits enzymatiques par la méthode de SEDMAK & GROSSBERG (1977). Le principe de la méthode repose sur une coloration au Bleu de Coomassie des protéines, mesurée au spectrophotomètre à 610 nm.

Cette méthode, dérivée de celle de BRADFORD (1976), présente une excellente sensibilité (seuil de détection < 0,5 µg de protéines totales), et permet de travailler sur de très faibles volumes d'extrait enzymatique brut (de 5 à 20 µl).

Cet avantage est particulièrement appréciable, car nous ne disposons le plus souvent que d'un très faible volume d'extrait enzymatique brut (2 à 3 ml au maximum pour les prélèvements issus de bioréacteurs)

La courbe-étalon obtenue (fig. n° 16) a été réalisée à l'aide de SAB comme standard.

6) Mesure des échanges gazeux :

Les variations quantitatives d'oxygène au cours de la photosynthèse et de la respiration sont analysées à l'aide d'une électrode polarographique de type Clark. (YSI Model 53 : Biological Oxygen Monitor).

Les échantillons (5 ml de suspension ou 1g de tissus frais dans 4 ml de milieu) sont placés dans une cellule de mesure fermée et thermostatée (28°C).

L'étalonnage est réalisé en faisant buller dans la cuve de l'air puis de l'azote, afin de régler respectivement le 100 % et le 0 % en oxygène (équilibre avec de l'air à 21% d'O₂ 250 nmoles d'O₂ dissous. ml⁻¹). Pour la mesure de l'activité photosynthétique, l'éclairage saturant (10 000 µE. m⁻².s⁻¹) est assuré par une lampe halogène de 250 watts focalisée à l'aide d'une lentille à eau.

La figure n° 17 illustre le type de réponse enregistré sur des cellules photosynthétiquement actives.

D) METHODES D'ETUDE ENZYMOLOGIQUE :

1) Extraction et prépurification des protéines solubles :

a) Extraction des protéines solubles :

Le matériel végétal (cals ou cellules isolées) est rapidement congelé dans l'azote liquide. Les cals sont alors broyés au mortier pour donner une poudre homogène. Le matériel congelé est ensuite broyé dans du tampon d'extraction à l'aide d'un Ultra Turrax (30 secondes à 15 000 r.p.m.), ou d'une presse de French (2 passages à 1 000 psi). La composition des tampons varie avec la nature du système enzymatique à extraire ; elle est donnée en Annexe.

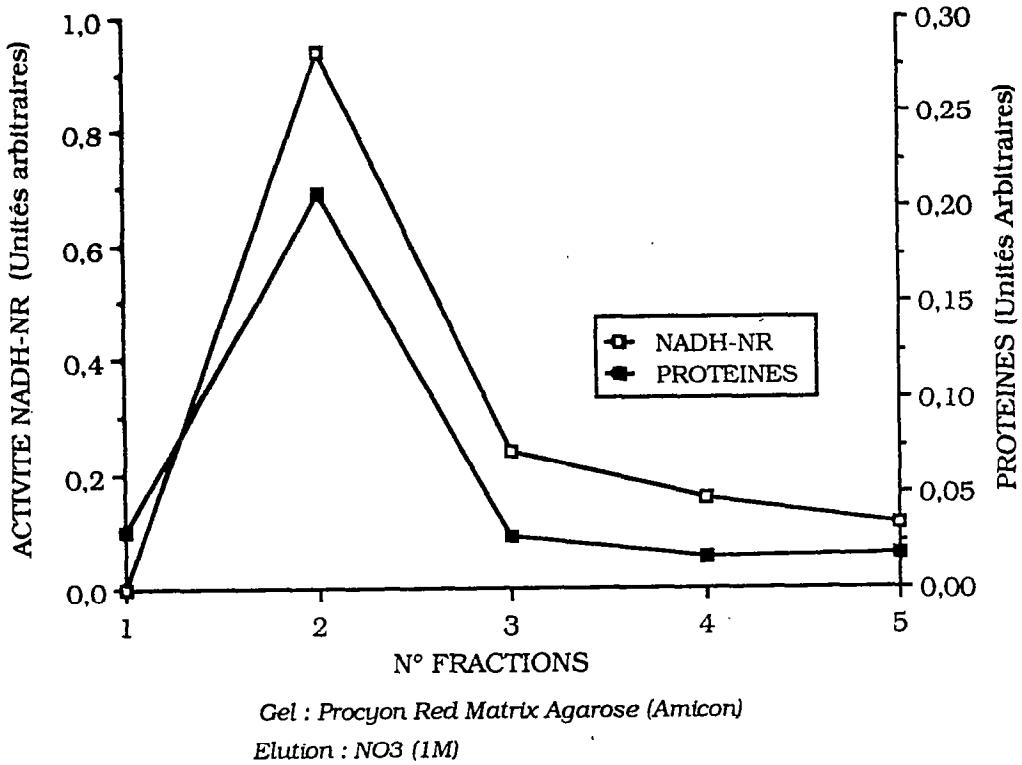
Le broyat est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 30 000 g (micro centrifugeuse réfrigérée Sigma). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique brut (EEB).

Toutes les activités enzymatiques (N.R., G.S., Rubisco, PEP Case) sont estimées par une moyenne de trois incubations différentes.

Figure n° 18 : Profils d'élution de la nitrate réductase selon deux méthodes de purification différentes

(A)

Purification de la Nitrate Réductase par chromatographie d'affinité



(B)

Purification de la Nitrate Réductase par centrifugation sur gradient de saccharose

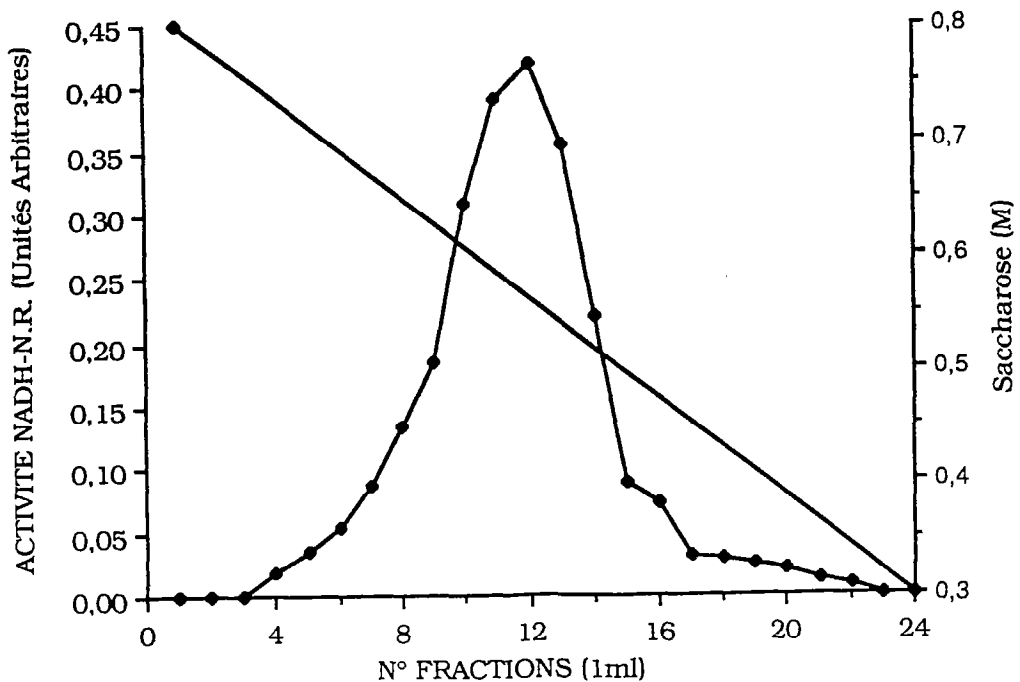


Figure n° 19

PURIFICATION de la RubP CARBOXYLASE

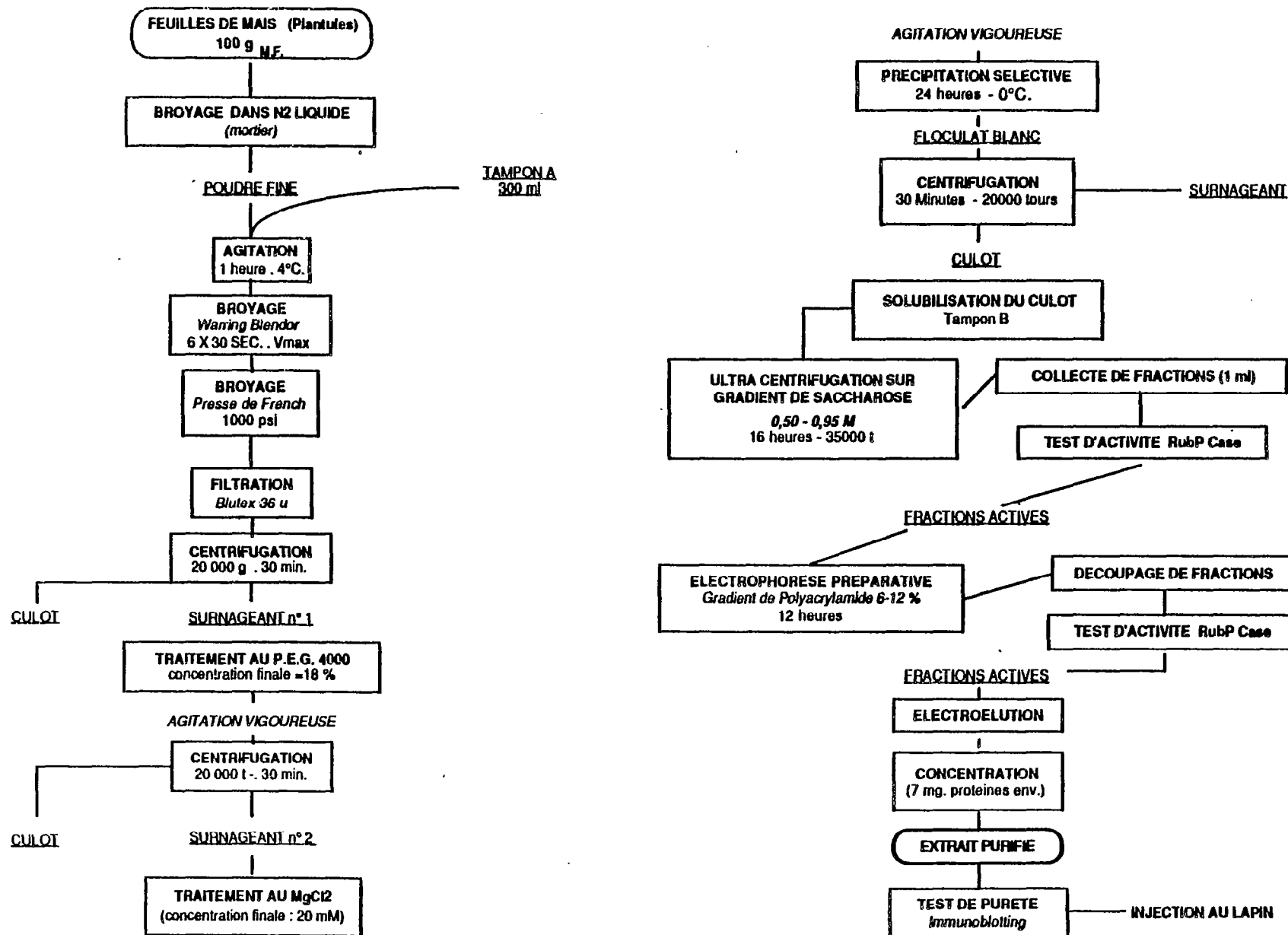
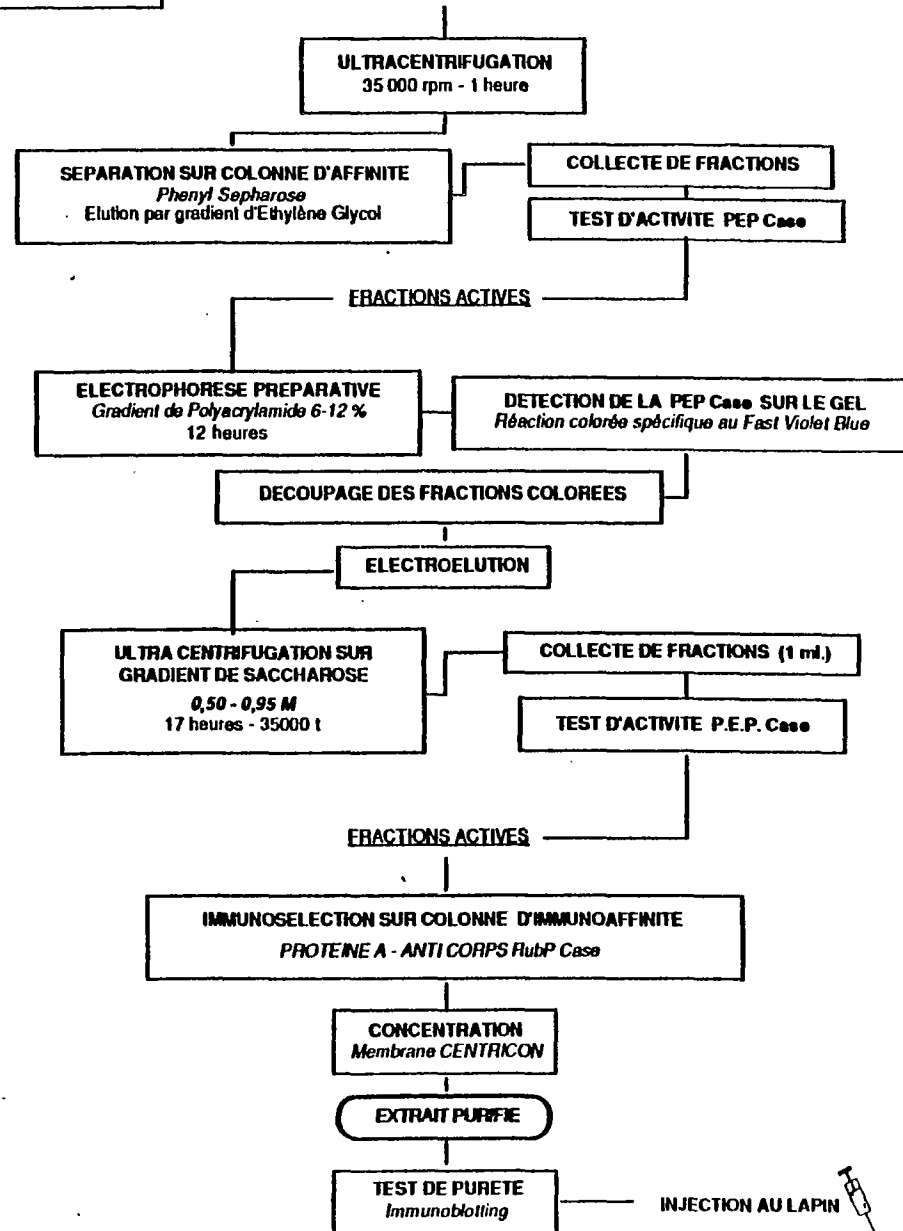
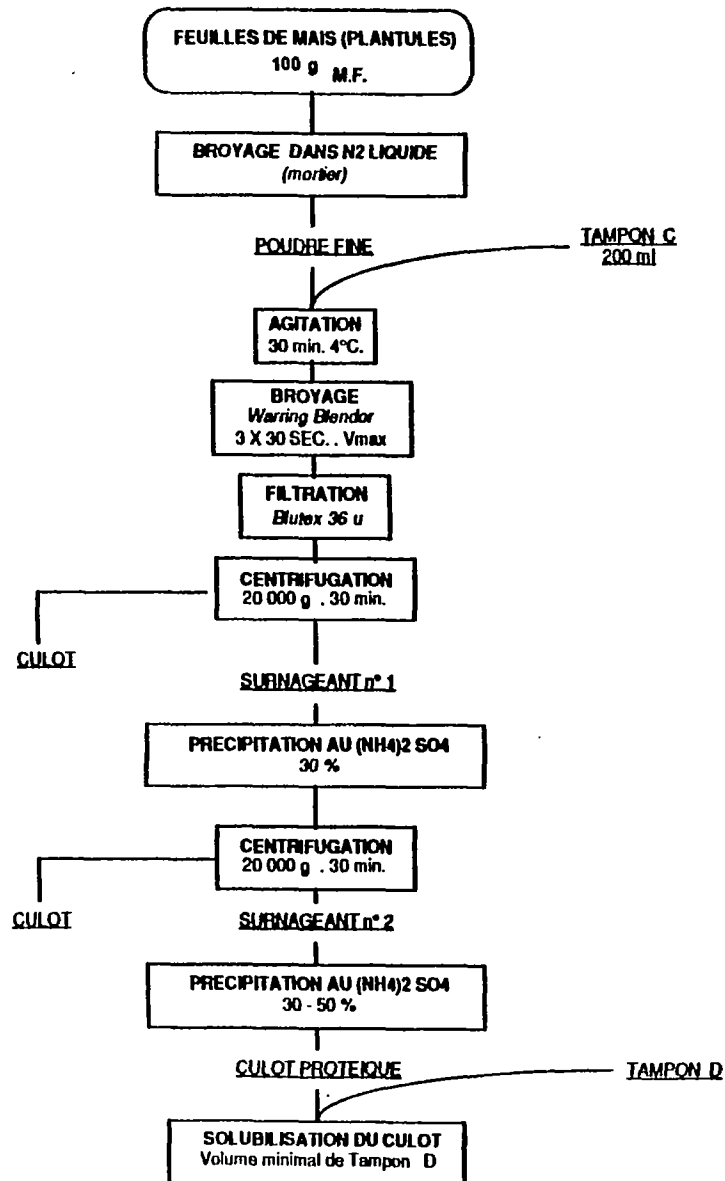


Figure n° 20

PURIFICATION de la PEP CARBOXYLASE



b) Prépuration des extraits bruts :

- Nitrate Réductase

Pour la mesure de l'activité Nitrate Réductase à l'aide du Bleu de Bromophénol comme donneur artificiel d'électrons, l'extrait enzymatique brut (EEB) doit être prépurifié. On élimine ainsi toute contamination par la Nitrite Réductase, utilisatrice de pouvoir réducteur, et consommatrice de nitrites. De plus, la mesure des constantes cinétiques de l'enzyme pour le nitrate nécessite un déssalage préalable.

Les protéines de l'EEB sont précipitées entre 20 et 45 % de sulfate d'ammonium, puis solubilisées dans le tampon d'extraction.

Dans les extraits de cals d'*Abrus* prépurifiés, aucune activité BBP-NR n'a pu être mise en évidence dans un premier temps, alors que l'activité NADH-NR était parfaitement mesurable. Le BBP a fonctionné comme substrat pour la Nitrite Réductase, qui a immédiatement consommé les nitrites formés, les rendant ainsi inaccessibles au dosage colorimétrique. Nous avons donc poursuivi la purification de l'extrait par chromatographie d'affinité.

Une mini-colonne d'affinité (voir la figure n° 26) a été réalisée avec un gel de Procyon Red Agarose (Amicon). La nitrate réductase est ensuite éluée par une solution de KNO_3 (1 M). Le profil d'élution est présenté sur la figure n°18 -A.

La Nitrate Réductase présente dans l'extrait a pu ensuite être mise en évidence à l'aide de BBP et de NADH.

Une pré-purification des extraits a été également effectuée par ultracentrifugation sur un gradient linéaire de saccharose (de 0,3 à 0,8 M) durant 15 heures à 30000 g, après précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20-45 %). Le profil d'élution de l'activité NR est présenté sur la figure n° : 18 -B.

Cette étape de purification indispensable peut également être réalisée suite à une gel-filtration (Sephadex G-25), par chromatographie d'affinité sur un gel de 5'-AMP-Sépharose, suivie par une élution au NADH (HOARAU - communication personnelle).

Nous avons également tenté de concentrer et déssaler les extraits bruts par ultrafiltration à 4°C, suivie de deux rinçages par un volume de tampon égal à celui de l'extrait.

Nous avons utilisé une cellule à ultrafiltration de marque Amicon d'un volume intérieur de 50 ml, équipé d'une membrane de type AMICON PM30, retenant les macromolécules de Poids Moléculaire supérieur à 30 000 Da).

- carboxylases : Rubisco et PEPC :

Les protocoles de purification des carboxylases en vue de la production d'IgG sont donnés sur les figures n° 19 & 20 .

2) Mesure des activités NADH-Nitrate Réductase et BBP-Nitrate Réductase :

a) Dosage colorimétrique de l'activité NADH-Nitrate Réductase :

L'extrait enzymatique est incubé en présence de 100 μ l de KNO_3 (100 mM) et de 100 μ l de NADH (8 mM), pour un volume total d'incubation de 900 μ l. Les concentrations finales en substrats et cofacteurs sont les suivantes:

- NADH :	0,9 mM
- NO_3 :	1,1 mM
- Tris-HCL (pH = 7,6) :	100 mM
- EDTA :	1 mM
- DTT :	1 mM
- FAD :	10 μ M
- PMSF :	0,250 mM

Nota : toutes les solutions étant effectuées dans le tampon d'extraction NR, (voir Annexe A; § : 3) les composantes de ce dernier se retrouvent à leur concentration originale dans le milieu d'incubation.

L'incubation est réalisée à 30°C pendant 30 minutes. La réaction est stoppée par précipitation des protéines à l'aide de 100 μ l de ZnSO_4 (1 M). Après centrifugation (30 000g - 15 min.), les nitrites sont révélés par colorimétrie (SNELL & SNELL, 1949). On rajoute 1 ml d'une solution de N1- Naphtyl éthylène diamine dihydrochlorure (0.3% dans HCl 3N), puis 1 ml d'une solution de sulfanilamide (0,02%).

Après 15 minutes, la Densité Optique est lue à 540 nm, et la teneur en nitrites exprimée par référence à une gamme-étalon de 0 à 100 nanomoles en NO_2 . Un tube où l'incubation est arrêtée au temps zéro sert de référence ; il permet de prendre en compte les nitrites déjà présents dans l'extrait enzymatique.

L'activité NADH-N.R. est exprimée en micromoles de nitrites (NO_2) formées par minute et par mg de protéines ou de biomasse.

b) Dosage colorimétrique de l'activité Bleu de Bromophénol-Nitrate Réductase : (HOARAU et al. - 1986 ; CAMPBELL - 1986) :

L'extrait enzymatique prépurifié est incubé dans le même tampon que pour la mesure de l'activité NADH-NR, en présence de 100 μ l d'une solution de KNO_3 (100 mM), de 100 μ l de bleu de bromophénol (2 mM), et de 100 μ l d'une solution de dithionite de sodium (80 mg de dithionite de Na + 80 mg d'hydrogénocarbonate de Na pour 10 ml d' H_2O). Le volume total d'incubat est ajusté à 1 ml.

Les concentrations finales dans le milieu d'incubation sont :

- NO_3 :	1,0 mM
- BBP :	0,2 mM
- Dithionite de Na :	0,46 mM
- Hydrogénocarbonate de Na :	0,12 mM
- Tris-HCL (pH = 7,6) :	100 mM
- EDTA :	1 mM
- FAD :	10 μ M
- DTT :	1 mM

- PMSF :

0,250 mM

Après 5 minutes à 30°C, l'incubation est stoppée par agitation vigoureuse des tubes (oxydation totale du dithionite). Les nitrites formés sont révélés par spectrocolorimétrie, comme précédemment.

3) Dosage colorimétrique de l'activité GS : Méthode de : O' NEAL & JOY (1973) modifiée par GUIZ *et al.* (1979)

La Glutamine Synthétase catalyse *in vitro* la réaction :

Acide Glutamique + Hydroxylamine + ATP $\xrightarrow{-Mg^{2+}}$ γ Glutamyl hydroxamate + ADP + Pi

L'incubation de l'extrait enzymatique brut est réalisée à 30°C durant 30 minutes, sur un volume total de 750 μ l. Le milieu comprend :

- 450 μ l de mélange A (contenant substrats et cofacteurs)
- 50 μ l de solution d'ATP 8 mM
- 250 μ l d'extrait enzymatique brut (EEB)

Les concentrations finales dans le milieu d'incubation sont :

- Glutamate : 48 mM
- Hydroxylamine (NH₂OH) : 3,6 mM
- ATP : 0,5 mM
- MgCl₂ : 1 mM
- Tris-HCL (pH = 7,6): 100 mM
- EDTA : 2,5 mM
- β -Mercaptoethanol : 10 mM
- DTT : 1 mM
- PMSF : 0,250 mM

La réaction est stoppée par l'ajout de 750 μ l du mélange B. (*voir Annexes*)

Le γ -glutamyl hydroxamate formé réagit avec le FeCl₃ du mélange B pour donner un complexe coloré jaune-brun. Les protéines sont précipitées instantanément par les acides contenus dans le réactif.

Après séparation du culot protéique par centrifugation (30 000 g - 5 minutes), la Densité Optique du surnageant est lue au spectrophotomètre à 540 nm. La quantité de γ -glutamyl hydroxamate formée est déterminée à l'aide d'une gamme-étalon avec du γ GH comme standard, dans le tampon d'extraction privé d'ATP. (*voir la figure n° 54-A . Chapitre : Résultats & Discussions*)

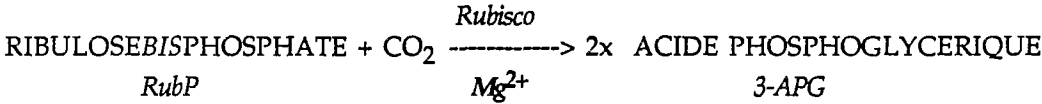
Remarque : Une adaptation de cette méthode de dosage a été réalisée par BARRAT (1980) pour la détection des isoformes actives de la GS après électrophorèse sur gel d'amidon.

4) Mesure d'activité des carboxylases : Rubisco & PEP Case :

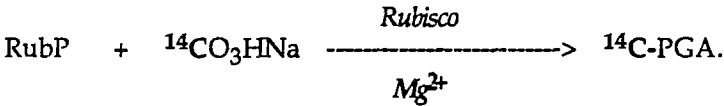
a) Dosage radio-chimique de l'activité Rubisco :

- *Principe de la méthode :*

La Ribulose 1-5 *bis*Phosphate carboxylase (Rubisco) catalyse dans les chloroplastes la réaction suivante :



Le dosage de l'activité RubP Case consiste en une incubation de l'extrait en présence du substrat (RubP) et de CO₂ marqué, sous forme de bicarbonate de Sodium : ¹⁴CO₃HNa. On mesure, en fin de réaction, la radioactivité émise par le produit formé (¹⁴C-PGA).



- *Protocole expérimental :*

Réactifs :

- solution de ¹⁴CO₃HNa :

Une dilution isotopique du substrat est effectuée afin d'obtenir une solution 2 mM en bicarbonate, de radioactivité spécifique : 2μCi.μmole⁻¹.

- solution de RubP :

On réalise une solution 0,5 mM : (7 mg/0,5 ml) dans du tampon d'extraction.

Incubation :

Elle s'effectue à 30°C durant 15 minutes, sur un volume total de 125 μl. : (12,5 μl de solution de ¹⁴CO₃HNa + 12,5 μl de solution de RubP+ 50 à 100 μl d'extrait enzymatique).

Le mélange réactionnel est constitué de :

- Tris - HCl (pH = 7,6)	100 mM
- Mg Cl ₂	10 mM
- DTT	5 mM
- EDTA	0,25 mM

L'activité Rubisco est mesurée en ajoutant :

- ¹⁴ CO ₃ HNa	200 μM
- RubP	50 μM

Une incubation-témoin est réalisée sans substrat (RubP)

La réaction enzymatique est stoppée par l'adjonction de 25 μl d'HCl 6N ; 2 x 50 μl du milieu d'incubation sont alors prélevés et mis dans des fioles à scintillation. Les fioles sont placées dans une étuve à 80°C jusqu'au séchage complet de l'extrait (évaporation du ¹⁴CO₂ en excès). On rajoute ensuite 100 μl d'eau bidistillée, puis 1,5 ml de

mélange scintillant (voir Annexes).

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un spectromètre à scintillation de type : *Intertechnique SL 30*.

Expression de l'Activité :

L'activité Rubisco de l'extrait s'exprime en micromoles de CO₂ fixées par heure et par mg de protéines ou de biomasse ; elle s'exprime de la manière suivante

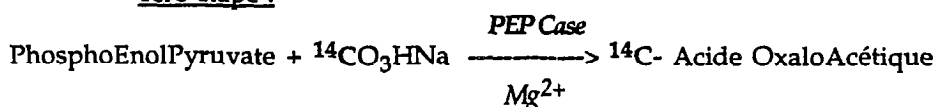
$$\begin{array}{lcl}
 \text{ACTIVITÉ RudiP Case:} & & \\
 \text{en } \mu\text{moles CO}_2 \text{ fixées/heure.} & = & \frac{(X \text{ impulsions} - Bf)}{60} \times \frac{150}{50} \times \frac{100}{70} \times \frac{1}{3,7 \cdot 10^4} \times \frac{1}{2} \times \frac{60}{15} \\
 & & \begin{array}{ccccccc}
 & \text{CONVERSION EN} & & \text{RENDEMENT} & & \text{RADIOACTIVITE} & \\
 & \text{COUPS PAR SECONDE} & & \text{DU COMPTEUR} & & \text{SPECIFIQUE} & \\
 & & & \text{ALIQUOTE POUR} & & \text{CONVERSION} & \text{PAR HEURE} \\
 & & & \text{COMPTAGE} & & \text{c.p.s. - } \mu\text{Cies} &
 \end{array}
 \end{array}$$

b) Dosage radio-chimique de l'activité PEP Carboxylase : (NATO & MATHIEU -1978) :

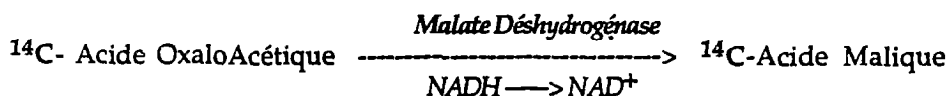
-Principe :

Ce dosage fait également appel à l'utilisation de ¹⁴CO₃HNa. Le principe du dosage est le suivant :

1ère étape :



2° étape :



L'acide oxaloacétique formé peut se décarboxyler très facilement. La Malate déshydrogénase est rajoutée en excès afin d'assurer une transformation totale de l'oxaloacétate en malate, beaucoup plus stable (LANE *et al.* - 1969). La radioactivité portée par le ¹⁴C-Acide Malique est stoechiométriquement proportionnelle à la quantité de CO₂ fixée au cours de l'incubation.

Le suivi par spectrophotométrie à 340 nm de la diminution du taux en NADH

permet également de doser l'activité PEP Carboxylase (LANE *et al.* - 1969)

- *Protocole expérimental :*

Réactifs :

La dilution isotopique du $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ s'effectue comme pour le dosage d'activité Rubisco.

- Solution de Phosphoénolpyruvate: 60 mM dans du tampon d'extraction.
- Solution de NADH : 10 mM.
- Solution de Malate déshydrogénase : 15 000 unités (solution commerciale non diluée)

Incubation :

Les conditions de mesure et la composition du tampon de réaction sont les mêmes que pour la RubP Case. On incube 25 à 50 μl d'extrait enzymatique avec 12,5 μl de chaque solution ($^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$, PEP, NADH, MDH). Le volume total de l'incubat est ajusté à 125 μl avec du tampon d'extraction.

Les concentrations finales dans le milieu d'incubation sont :

- | | | |
|--------------------------------|-------|---------|
| - $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ | 20 mM | |
| - PEP | 6 mM | |
| - NADH ₂ | 1 mM | |
| - MDH | | (excès) |

Expression de l'activité :

L'activité PEP Carboxylase de l'extrait s'exprime en micromoles de CO_2 fixées par heure et par mg de protéines ou de biomasse, suivant le calcul donné au paragraphe précédent : *dosage de l'activité Rubisco*.

5) Techniques d'électrophorèse :

a) Electrophorèse sur gel d'amidon :

Afin de mettre en évidence l'activité de plusieurs systèmes enzymatiques importants du métabolisme primaire sur des suspensions cellulaires et leur éventuelle variabilité isozymique en cours de culture, nous avons utilisé la méthode mise au point par SECOND & TROUSLOT (1980).

On réalise une électrophorèse en système horizontal sur des gels d'amidon à 14 % en poids de tampon (amidon hydrolysé CONNAUGHT).

Le tampon de migration est de type Citrate de sodium 410 mM, à pH = 6,0.

La migration électrophorétique s'effectue sous une tension de 150 Volts (20 mA/gel environ) durant 5 à 6 heures à 6°C.

La migration est réalisée sur des extraits enzymatiques bruts de cellules, de cals, et de feuilles d'*Abrus*.

b) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

1) Préparation des gels de polyacrylamide :

La procédure suivie est adaptée des méthodes de LAEMMLI (1970) et de WEBER & OSBORN (1969). (Tous les tampons sont dégazés, puis filtrés sur des filtres Millipore de porosité 8 μm , puis 0,3 μm).

Les gels sont coulés dans des moules verticaux pour cuves à électrophorèse de type Lagon (BIORAD) suivant un gradient de concentration en polyacrylamide de 6 à 15 %. (Dans le préparateur de gradients, la solution à 15 % est stabilisée par du saccharose). Ce procédé permet d'obtenir une résolution nettement supérieure à celle obtenue avec des gels à porosité constante. Les produits utilisés (BDH) ne nécessitent pas de purification supplémentaire. En cas de nécessité, l'acide acrylique résiduel doit être éliminé du gel par l'action d'une résine adéquate.

Lors de la polymérisation des gels, on évite l'emploi du mélange TEMED + persulfate d'ammonium à action trop rapide. Le gel est polymérisé durant deux heures à la lumière bleue/violette (à défaut : lumière naturelle intense) en présence de riboflavine.

La solution de riboflavine (concentration finale : 10 mg.l^{-1}) est préparée dans de l'eau distillée, mise à agiter durant 12 heures, puis filtrée sur membrane Millipore 0,3 μm , avant d'être incorporée aux solutions d'acrylamide.

Une fois le gel polymérisé, on dépose 1 ml de butanol sur la tranche supérieure du gel, afin d'obtenir une ligne de séparation parfaite entre gel de focalisation (stacking gel) et gel d'électrophorèse.

2) Electrophorèse en conditions dénaturantes : (SDS PAGE)

La migration présente une meilleure résolution pour des volumes de dépôt inférieurs à 20 μl , avec une teneur en protéines solubles de l'extrait d'environ 2 mg.ml^{-1} . Pour une plus grande facilité de dépôt, les extraits sont densifiés à l'aide de saccharose (40 % environ).

L'extrait doit être exempt de toute présence de sels minéraux qui provoqueraient des traînées sur le gel. L'extraction du matériel végétal doit donc être réalisée à l'aide de tampon Tris, et les extraits issus de précipitations au sulfate d'ammonium obligatoirement dessalés avant électrophorèse.

La dénaturation des extraits est réalisée dans des cônes Eppendorf, sur un mélange extrait enzymatique/solution dénaturante (1/1), durant 7 minutes à 100°C. La composition du mélange dénaturant utilisé est donnée en Annexe B, § n° 4).

Parallèlement, une solution de marqueurs de poids moléculaires standards étalonnés de 14,3 à 200 kD est dénaturée dans les mêmes conditions.

La migration électrophorétique s'effectue sous une tension de 150-200 V, (Intensité : 40 mA maximum/gel), durant 4 à 7 heures, à 11°C. Une thermostatisation fiable de la cuve à électrophorèse est indispensable, pour une bonne homogénéité et une répliquabilité dans le temps des résultats. De plus, lors d'une migration à basse température, les protéines diffusent moins facilement dans le gel, et présentent alors des bandes plus nettes. Les systèmes de type "Lagon" utilisés sont livrés avec un système de thermostatisation pour la partie inférieure de la cuve. Il est nécessaire de modifier

Tableau n° 6 : REVELATIONS SPECIFIQUES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

SYSTEME ENZYMATIQUE	GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH)	PEROXYDASES (POX)	GLUTAMATE OXALOACETATE TRANSAMINASE (GOT)	PHOSPHATASE ACIDE (PAC)
SUBSTRATS	Glutamate de Na NAD	H ₂ O ₂ (0,01%)	Acide Aspartique Acide Ketoglutarique	Naphtyl Acid Phosphate
COFACTEURS	-	CaCl ₂ 0,1M	-	-
SYSTEME DE COLORATION	Nitroblue Tetrazolium (NBT) Phenazine methosulfate (PMS)	3-Amino-9-Ethyl Carbazole (40%) Diméthyl formamide (5%)	Pyridoxal 5' Phosphate Fast Blue BB Salt	Fast Garnet GBC
REACTION CATALYSEE	Glutamate + NAD GDH oxoglutarate+NADH+ NH ₄ ⁺	H ₂ O ₂ ---POX---> 2H ₂ O + O ₂	L-Aspartate+Ketoglutarate GOT L-Glutamate + Oxaloacetate	Naphtyl Phosphate PAC Naphtol + Acétate
PRINCIPE DE LA REVELATION	oxydation du PMS réduction du NBT en sels de Formazan ppté bleu insoluble	Oxydation du 3-Amino-9-Ethyl Carbazole en noir (gel coloré en rouge-brun)	Coloration verte du Fast Blue BB Salt (gel coloré en rouge-brun)	Coloration du Fast Garnet GBC en noir (gel coloré en orange)
TAMPON DE REVELATION	Tris/Citrate 500mM (pH=8,5)	Acétate 50mM (pH=5,0)	Tris-Hcl 500 mM (pH=8,5) pH de la coloration entre 7,8 et 8,0 OBLIGATOIREMENT	Acétate 50mM (pH=5,0)
NATURE DU GEL D'AMIDON	Amidon à 14g/100ml de Tampon Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0	Amidon à 14g/100ml de Tampon Tris/Citrate pH = 8,0	Amidon à 14g/100ml de Tampon Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0	Amidon à 14g/100ml de Tampon Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0
TAMPON DE MIGRATION	Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0	Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0	Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0	Tris/Citrate 410 mM pH = 8,0

légèrement la partie supérieure (lieu d'échauffement en cours de migration) pour y installer également une circulation de tampon thermostaté, à l'aide d'une petite pompe péristaltique. On utilise ici un tampon Tris-glycine à pH : 8,3. (Voir Annexe A; § n° 5)

Après électrophorèse, les bandes de migration peuvent être révélées par les procédés classiques au Bleu de Coomassie, ou au nitrate d'argent.

En vue d'une longue conservation, les gels sont placés durant 3 heures à 40°C entre une feuille de papier Whatman et une feuille de papier cellophane dans un sécheur de gels (BIORAD Slab Gel Dryer. Model 543).

3) Révélation spécifiques d'activités enzymatiques :

Ces méthodes ont été mises au point par SECOND & TROUSLOT (1980) au sein du Laboratoire de Génétique et d'Amélioration des Plantes Tropicales du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

Elles permettent de mettre en évidence, sur gel d'électrophorèse, l'activité de treize systèmes enzymatiques différents, et de caractériser ainsi leurs isoformes actives.

Nous avons étudié quatre systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme primaire :

- | | |
|-----------------------|---|
| - 2 oxydoréductases : | Glutamate déshydrogénase (GDH) et
Péroxydase (POX) |
| - 1 hydrolase : | Phosphatase acide (PAC) |
| - 1 transférase : | Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) |

Les techniques d'électrophorèse et de colorations spécifiques employées sont rassemblées dans le tableau n° 6.

6) Marquage à la Méthionine ³⁵S des protéines solubles :

a) Incorporation de la Méthionine ³⁵S :

Elle est réalisée sur des suspensions cellulaires photomixotrophes d'*Abrus precatorius* (lignée 6H) âgées de 14 jours.

La suspension cellulaire, en phase de croissance stationnaire est repiquée dans un milieu neuf à raison de 5 grammes M.F. de cellules pour 70 ml. Deux lots sont constitués : les suspensions témoins sont repiquées dans un milieu contenant de la méthionine ³⁵S 1000 Ci/mmole - 0,15 mCi/flacon ; les autres lots sont constitués de suspensions repiquées dans le même milieu contenant un inhibiteur de protéosynthèse : la cycloheximide

Quinze heures après le repiquage, les cellules sont récoltées par filtration sur une toile de nylon (Blutex 36 µ). Des temps d'incubation plus longs ont été testés sans succès ; on obtient un marquage très diffus, difficilement interprétable. Une période trop longue, donc supérieure au turn-over des enzymes, ne permet pas de rendre compte fidèlement des néosynthèses précoces qui ont lieu dans les premières heures suivant le repiquage.

La radioactivité est estimée sur 3 fractions :

- le milieu de culture débarrassé des cellules,
- le milieu intracellulaire après broyage (2 passages à la presse de French. 1 000 psi). On obtient alors un extrait protéique brut.

- le culot protéique (après précipitation de l'extrait brut au TCA 0,2 N).

Les comptages de radioactivité sont réalisés directement sur des aliquotes de milieu de culture et d'extrait enzymatique brut, (gamme de 10 à 100 μ l), et après précipitation durant 15 heures à 4°C de l'EEB par du TCA 0,2 N (fraction protéique).

b) Electrophorèse SDS-PAGE et autoradiographie des protéines marquées :

Un aliquote des extraits cellulaires bruts des différents lots sont ensuite soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE, dans les conditions décrites plus haut. (*voir : § 5 b -2 de ce même chapitre*).

Après la migration, les protéines marquées au ^{35}S sont révélées par autoradiographie. Les gels sont fixés dans un mélange méthanol/acide acétique durant 45 minutes. Ils sont ensuite imprégnés d'une solution scintillante (EN_3 HANCE NEN - Dupont) pendant 45 minutes. Les gels sont ensuite lavés 3 fois pendant 10 minutes à l'eau distillée. Ils sont ensuite séchés durant 3 heures à 60°C dans un sécheur de gel (*Biorad Slab Gel dryer-Model 543*), puis mis en contact avec un film à autoradiographie (*Amersham β Max Hyperfilm*) durant 2 à 4 jours à - 80°C.

Afin de déterminer si la radioactivité incorporée se retrouve dans quelques enzymes-cibles (Rubisco, NR, GS), une immunosélection croisée est réalisée à l'aide de mini-colonnes de gels d'immunoaffinité. (*Voir la partie E : Méthodes immunoenzymologiques : § 6*)

Les extraits enzymatiques issus de chaque lot de cellules (Témoin, Cycloheximide) sont élués successivement sur les colonnes portant les anticorps dirigés contre les enzymes suivantes :

- IgG Anti RubP de Tabac (LSMP Orsay)
- AcMc Anti NR de Tabac (INRA n° ZM 96(9)25 - CHEREL *et al.* - 1985)
- Sérum pré immun de lapin (contrôle)

Les protéines fixées sur les gels d'immunoaffinité sont ensuite dénaturées (*comme décrit précédemment*), puis subissent une électrophorèse SDS-PAGE.

La révélation des bandes de migration s'effectue par autoradiographie du gel comme décrit ci-dessus pour les extraits totaux.

E) METHODES IMMUNOENZYMOLOGIQUES :

Ces méthodes ont été acquises au sein du Laboratoire de Structure et Métabolisme des Plantes (Service de Mr le professeur BOURDU) à l'Université de Paris XI - Orsay, au cours de quatre stages effectuées en 1987 et 1988.

1) Obtention d'Anticorps polyclonaux :

a) Purification des systèmes enzymatiques :

L'obtention d'une protéine aussi pure que possible constitue, évidemment, un préalable indispensable à la production d'anticorps monospécifiques.

Nous décrivons ici les procédés de purification de deux carboxylases végétales : la Phosphoenol Pyruvate Carboxylase (E.C. 4.1.1.38) et la Ribulose bisphosphate Carboxylase (E.C. 4.1.1.39), extraites à partir du même matériel végétal : des feuilles issues de plantules de *Zea mays* cv. : INRA F7F2, cultivées en serre.

Les protocoles de purification sont donnés sous forme de schémas simplifiés (figures n° 19 & 20)

Ils font appel à des techniques désormais classiques (chromatographie d'affinité, gel filtrations,...) couplées, le plus souvent en fin de purification, à des tests immunochimiques du type immunoempreintes ou immunosélection, permettant de caractériser indiscutablement la pureté de la préparation enzymatique.

La composition des tampons et réactifs utilisés est toujours présentée en Annexe .

b) Procédé d'immunisation d'un lapin :

Nous utiliserons une méthode dérivée de celle proposée par JURD (1978) afin de produire des anticorps polyclonaux Anti-Rubisco. Dans ce but, nous immuniserons un lapin contre un extrait purifié de Rubisco obtenu à partir de feuilles de plantules de *Zea mays*.

La chronologie des différentes étapes est la suivante :

JOUR 0 :

Après une électrophorèse préparative, (voir *Protocole de purification de la Rubisco . fig n° 19*) les fractions de gel de polyacrylamide présentant une forte activité RubP Carboxylase sont homogénéisées au broyeur de Potter en présence d'adjuvant de Freund (Difco). Le polyacrylamide, sans effet sur l'animal, agit ici comme adjuvant supplémentaire.

Avant injection, on réalise une première saignée, qui fournit le sérum pré-immun servant de témoin pour toutes les manipulations immuno chimiques (SPI).

La totalité des fractions actives est broyée et injectée en 4 à 5 piqûres sous-cutanées sur le dos du lapin (*race : Fauve de Bourgogne*).

JOUR 10 :

Le lapin subit une deuxième injection d'antigène par piqûre intra-veineuse dans la veine de l'oreille. On injecte alors en quatre fois 0,8 ml de la solution suivante : 0,6 ml d'extrait enzymatique purifié de RubP Carboxylase (obtenu après électroélution - voir *Fig. n° 19*) auxquels sont rajoutés 0,2 ml d'adjuvant de Freund incomplet. On effectue 4 injections de 0,2 ml chacune, à deux jours d'intervalle (10°, 12°, 14° et 16° jour).

JOUR 30 :

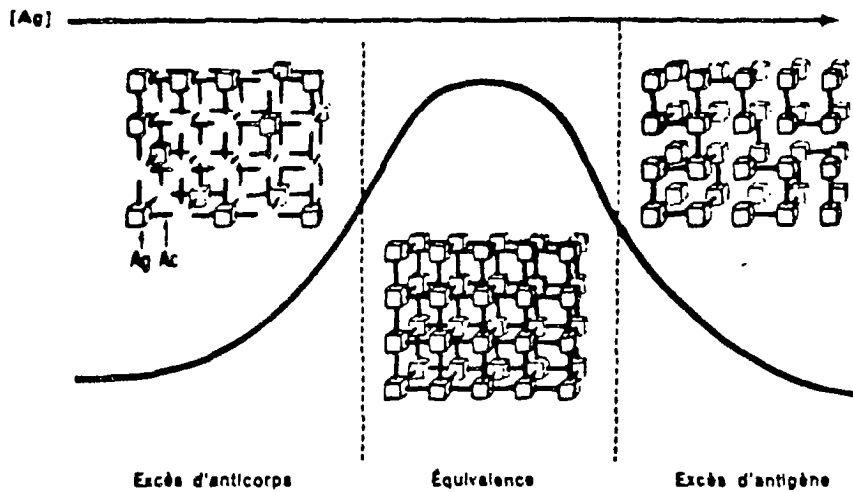
On réalise une saignée du lapin par incision d'une veine auriculaire marginale. Le sang est soutiré soit par aspiration (à l'aide d'un dispositif spécial relié à une trompe à vide), soit à pression normale par simple écoulement dans un bécher ; 25 à 30 ml de sang sont ainsi prélevés. Ils conduiront à l'anti- sérum AC₂.

JOUR 40 :

Le lapin reçoit une troisième injection d'antigènes : 0,2 ml de solution d'enzyme purifiée (500 µg de protéines) + 0,1 ml d'adjuvant de Freund incomplet, en deux injections sous-cutanées.

JOUR 60 :

Figure n° 21 : Mise en évidence d'un point d'équivalence dans la formation d'un réseau d'immunoprécipitation



— Précipitation quantitative. Des quantités croissantes d'antigène sont ajoutées à une quantité fixe d'anticorps. Le surnageant contient des anticorps libres en excès d'anticorps (à gauche) et de l'antigène libre en excès d'antigène (à droite). Le surnageant ne contient ni antigène ni anticorps à l'équivalence (au centre).

d'après BACH (1979)

Une deuxième saignée, réalisée comme décrit précédemment, fournit l'antisérum AC₃.

c) Préparation et purification du sérum :

Le sang recueilli par saignée est mis à coaguler durant 24 heures à 4°C. Il est ensuite centrifugé à 1 500 g pendant 30 minutes. Le surnageant, réparti en aliquotes de 1 ml, est mis à congeler à - 80°C. Il constitue l'antisérum brut, qui contient les anticorps polyclonaux (IgG), utilisés pour les tests immunochimiques ultérieurs.

Les immunoglobulines G (IgG) de l'antisérum brut peuvent être purifiées à l'aide des techniques classiques de séparation des protéines : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur résine échangeuse d'ions (DEAE Cellulose), gel filtration (Sephadex G 200) ...

Nous avons prépurifié, en routine, les IgG obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium à 45 %. Le culot est repris par du tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 7,6), et la précipitation est réitérée jusqu'à décoloration complète du sérum (élimination des hémoglobines).

La pureté des anticorps, ainsi que leur éventuelle capacité à former des immunoprécipités avec leurs antigènes, est vérifiée à l'aide de tests simples d'immunodiffusion en gel d'agarose.

2) Tests d'immunodiffusion :

a) Test d'OUCHTERLONY (1949,1967) : (double immunodiffusion sur gel)

- Principe :

Antigènes (extraits enzymatiques bruts) et anticorps (antisérum de lapin) sont mis à diffuser librement à partir de puits creusés dans un gel d'agarose faiblement concentré coulé sur une plaque de verre. Ils donnent lieu, à l'équivalence, à la formation d'un arc d'immunoprécipitation. (figure n° 21)

Si la concentration en anticorps est en excès relatif par rapport à celle d'antigènes, les bandes se forment plus près du puits contenant l'antigène ; l'inverse est observé en cas d'excès en antigènes.

Pour vérifier la monospécificité d'une préparation d'anticorps, on réalise un test d'OUCHTERLONY face à des extraits enzymatiques végétaux non purifiés. On doit alors observer, pour une préparation d'IgG monospécifique, un arc d'immunoprécipitation unique. Si les arcs observés sont dédoublés, plusieurs systèmes enzymatiques présents dans l'extrait brut sont reconnus, et l'on peut conclure à une non-spécificité de la préparation utilisée. L'efficacité des anticorps est vérifiée par immunodiffusion face à une solution d'enzyme purifiée du commerce.

- Préparation des plaques d'OUCHTERLONY :

La solution tampon d'immunodiffusion (voir Annexe A ; § 6) est chauffée jusqu'à ébullition dans un four à micro-ondes, afin de dissoudre l'agarose.

Elle est ensuite coulée sur une lame histologique (80,5 x 30 mm) parfaitement nettoyée à l'alcool. Les lames sont placées à 4°C durant 30 minutes pour parfaire la

gélification. Sept puits disposés aux sommets et au centre d'un hexagone sont pratiqués à l'aide d'un emporte-pièces adéquat.

Les plaques de verre sur lesquelles sont coulés les gels sont disposées sur une table à niveau : la surface horizontale garantit l'uniformité de l'épaisseur du gel.

- Incubation :

Les puits sont remplis avec 10 à 15 μ l de solution d'antigènes (puits périphériques) et d'anticorps (puits central). La diffusion s'effectue en chambre humide (enceinte close saturée) afin d'éviter la déshydratation des gels. Elle se poursuit durant 24 heures à 4° C. Une incubation témoin est réalisée dans les mêmes conditions avec du sérum pré-immun, afin de déceler la présence éventuelle d'arcs de précipitation parasites.

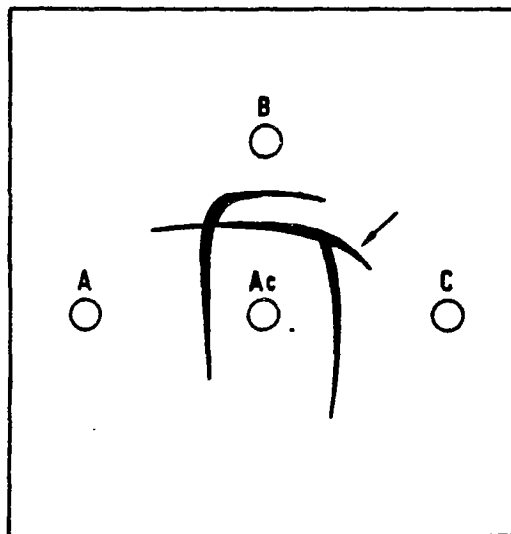
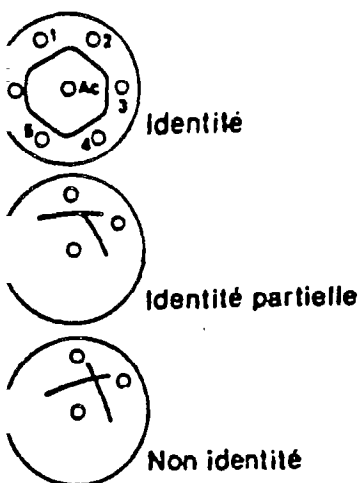
- Révélation des arcs d'immunoprécipitation :

Après incubation, les protéines qui n'ont pas précipité sont éliminées de la plaque par trempage dans une solution de NaCl 9 ‰/oo. Ce lavage s'effectue durant 12 heures à 4°C sur un agitateur à balancement. Les plaques sont ensuite séchées entre deux feuilles de papier filtre épais dans une étuve à 40°C. Elles sont alors mises à tremper dans un mélange colorant durant quelques heures, puis lavées dans un mélange décolorant.

La composition des solutions de coloration et décoloration est donnée dans l'Annexe B; § 5 & 6.

Pour une révélation optimale des arcs de précipitation, il est recommandé de réaliser plusieurs cycles : coloration/décoloration/séchage.

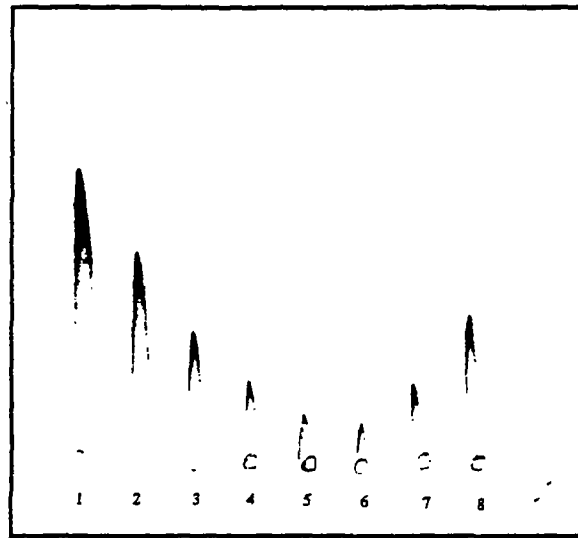
Les tests d'Ouchterlony présentent l'avantage de permettre une comparaison directe de plusieurs préparations antigéniques, et de mettre en évidence leurs éventuelles parentés immunologiques :



— Analyse des réactions croisées dans la technique d'Ouchterlony. L'anti-sérum placé dans le puits central a été préparé contre l'antigène B, qui le précipite en donnant deux lignes de précipités. Il est aussi précipité par les deux antigènes A et C. L'antigène A possède un déterminant identique à l'antigène B et le précipité donné par A est dans la prolongation directe d'un des deux précipités donnés par B. C'est une réaction d'identité totale (l'antigène B pourrait aussi être contaminé par l'antigène A, ce qui expliquerait que l'antigène A ne possède qu'un des deux déterminants présentés par B). L'antigène C possède un déterminant voisin de B (réaction d'identité partielle). La projection indiquée par la flèche est située du côté opposé au puits contenant l'antigène B contre lequel l'antisérum a été produit.

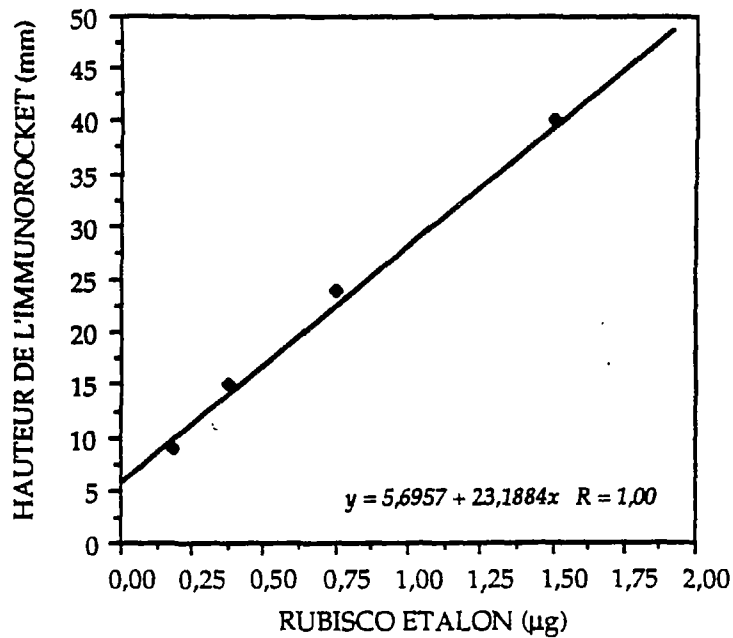
Figure n° 22 : Immunoélectrophorèse et droite-étalon pour la Rubisco

Immunoélectrophorèse de Laurell



- Puits n° 1 : Rubisco Epinard purifiée étalon (env. 3 μ g protéines)
 Puits n° 2 : Rubisco Epinard purifiée étalon (dilution 1/2)
 Puits n° 3 : Rubisco Epinard purifiée étalon (dilution 1/4)
 Puits n° 4 : Rubisco Epinard purifiée étalon (dilution 1/8)
 Puits n° 5 : Rubisco Epinard purifiée étalon (dilution 1/16)
 Puits n° 6 : Extrait enzymatique brut. feuilles de maïs (dilution 1/4)
 Puits n° 7 : Extrait enzymatique brut. feuilles de maïs (dilution 1/2)
 Puits n° 8 : Extrait enzymatique brut. feuilles de maïs (env. 1 μ g protéines)

Droite-étalon pour la Rubisco



b) Test d'immunodiffusion radiale : Méthode de MANCINI et al. (1965).

- Principe :

Tout comme les tests d'OUCHTERLONY, la méthode de MANCINI est basée sur les propriétés d'immunoprécipitation du complexe Antigène - Anticorps.

On coule un gel d'agarose contenant l'antisérum sur une lame de verre pour microscope. La solution d'antigènes, préalablement déposée dans un puits, diffuse librement dans l'agarose et donne lieu à la formation d'un halo d'immunoprécipitation dont le diamètre observé est proportionnel à la concentration initiale en antigènes.



Cette méthode permet de déterminer approximativement la teneur en antigène d'un extrait enzymatique. Il suffit de comparer le diamètre de l'anneau d'immunoprécipité avec ceux obtenus avec des quantités connues d'antigène purifié.

- Préparation des plaques de MANCINI :

La préparation du gel et les tampons utilisés sont identiques à ceux des tests d'Ouchterlony. Après dissolution à chaud de l'agarose, on laisse la solution refroidir jusqu'à 40° C environ, pour éviter une thermodégradation de l'antisérum. La préparation d'anticorps est alors rajoutée, et homogénéisée vigoureusement ; les plaques sont coulées le plus rapidement possible. On doit calibrer la quantité d'anticorps à diluer, pour trouver l'équilibre antigène/anticorps indispensable à la formation du halo d'immunoprécipitation.

Après refroidissement des plaques à 4°C, les puits sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce adéquat.

L'incubation et la coloration des plaques s'effectuent comme pour les tests d'Ouchterlony. Les réseaux d'immunoprécipitations forment alors un disque, dont le diamètre est proportionnel à la quantité d'antigènes déposée.

3) Immunoélectrophorèse : Méthode de LAURELL. (1966) modifiée par WEEKE (1973)

a) Principe :

Cette méthode, dérivant de celle de MANCINI, permet de mesurer de manière simple et rapide de très faibles quantités d'antigènes.

Un antisérum monospécifique est incorporé dans une plaque de gel d'agarose. Différentes concentrations de la préparation antigénique à doser sont réparties dans des puits alignés. Un champ électrique est alors appliqué perpendiculairement à la ligne des puits. Un halo d'immunoprécipitation en forme de fusée (immunorocket) se forme et progresse tant que l'antigène est en excès. L'existence d'une relation linéaire entre la concentration d'antigènes dans les trous et la hauteur (ou la surface) du précipité permet

d'utiliser cette technique pour un dosage précis et sensible des antigènes. (Fig. n° : 22 -A)

La précision de cette détermination est nettement supérieure à celle obtenue avec la technique de Mancini. En effet, grâce à une électrophorèse très longue, la totalité des antigènes présents dans le puits est entraînée et participe à l'immunoprécipitation.

La spécificité des anticorps utilisés doit être excellente pour éviter la formation de pics dédoublés. Il est indispensable de réaliser une série de tests préliminaires pour chaque extrait enzymatique à caractériser, afin de fixer la quantité optimale d'anticorps à incorporer au gel. Si la teneur en anticorps est trop faible, on obtient des pics très hauts, sans relation de linéarité avec la quantité d'antigènes déposée.

On établit une relation linéaire entre la hauteur du pic obtenu et la quantité pondérale d'enzyme pure déposée (Figure n° 22 -B).

b)Préparation des plaques pour électrophorèse de LAURELL :

La solution gélosée contenant les anticorps est coulée sur une plaque de verre de 8 cm x 8 cm - ou de 8 cm x 17 cm - (*Composition des tampons en Annexe A*).

L'incorporation des anticorps s'effectue, comme pour les plaques de MANCINI, à 40° C. Après gélification de la solution, une série de puits alignés est creusée à l'aide d'un emporte-pièces adéquat.

4 µl de solution d'antigène (extrait enzymatique concentré) sont déposés dans chaque puits. On réalise plusieurs dilutions "en cascade" de l'extrait et de la solution d'enzyme étalon du commerce.

c)Electrophorèse :

La plaque est soumise à une électrophorèse horizontale dans une enceinte saturée en humidité. La migration s'effectue à 4°C, sous une tension de 150 mV (50 mA/plaque) durant 5 heures (ou 80 V durant 12 heures). Le tampon de migration est du type Tris/Glycine pH = 8,3.

Après électrophorèse, la plaque est lavée, puis les immunoprécipités sont colorés suivant le procédé décrit plus haut.

4) Immunotitration de l'activité enzymatique ou immunoinactivation :

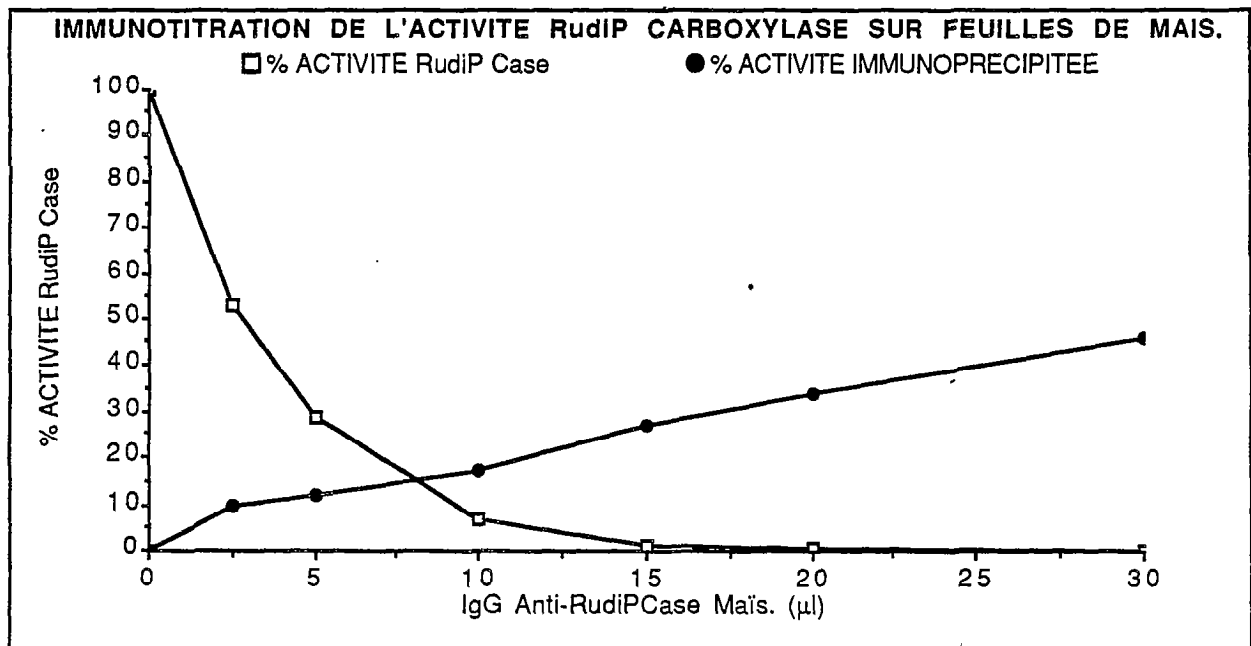
Ces tests simples permettent de compléter les résultats obtenus après immunodiffusion en gel (OUCHTERLONY). Ils mettent en évidence la reconnaissance spécifique entre anticorps (IgG ou AcMc) et protéine antigénique.

L'extrait enzymatique, brut ou purifié, est incubé en présence de concentrations croissantes en antisérum (IgG). On trace la courbe donnant la perte d'activité de l'enzyme (en % d'activité par rapport au témoin sans anticorps) en fonction de la quantité d'anticorps présents (en µl d'antisérum IgG ou en µg d'équivalent-protéines). La protéine enzymatique se trouve emprisonnée dans le réseau d'immunoprécipité. Après centrifugation, l'activité résiduelle est dosée dans le surnageant du milieu d'incubation.

Pour la RubP Carboxylase, une grande partie de l'activité se retrouve dans l'immunoprécipité : la formation du réseau de précipitation n'affecte pas, dans ce cas, les sites actifs de l'enzyme. Par contre, lors de l'immunotitration de l'activité Nitrate Réductase, le culot de précipité ne présente plus aucune activité ; les anticorps bloquent alors les sites actifs. (Figure n° 23).

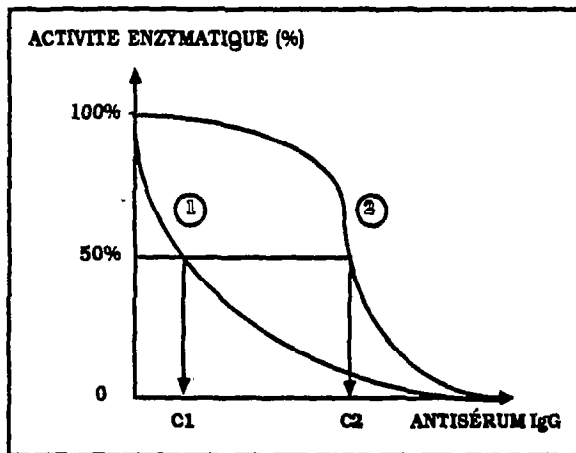
La quantité d'IgG nécessaire pour obtenir 100 % d'inactivation peut donner (par

Figure n° 23



référence à la courbe d'immunotitration, par le même antisérum, d'une enzyme purifiée du commerce), une approximation de la quantité d'enzyme active présente.

Les courbes d'immunotitration fournissent des renseignements originaux concernant les diverses formes actives/inactives d'une protéine enzymatique et leur antigénicité.



1) Les extraits 1 et 2 présentent la même quantité de protéines au 100%:

Pour une même perte d'activité (50%), la quantité d'IgG mobilisée est nettement plus forte pour l'extrait n°2. Cet extrait contient donc moins d'enzyme par unité de protéine

2) Les extraits 1 et 2 présentent la même activité spécifique au 100%:

Pour une même perte d'activité (50%), la quantité d'IgG mobilisée est nettement plus forte pour l'extrait n°2. Cet extrait est plus riche en formes INACTIVES de l'enzyme. Il présente une antigénicité supérieure pour une activité identique.

Dans l'extrait n°2, il faut plus d'enzyme, en quantité pour assurer la même activité que dans l'extrait n°1.

Dans le cas d'enzymes inductibles (du type Nitrate Réductase, par exemple), l'examen de courbes d'immunotitration, réalisées à activité égale au 100% sur des extraits induits/non-induits, peut renseigner utilement sur la nature de l'induction : synthèse *de novo* de protéine active, ou activation de formes déjà présentes, par lecture directe du graphe obtenu.

5) Immunoempreintes : ou *immunoblotting*,

a) Principe :

Après une électrophorèse en conditions dénaturantes ou non, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Western blotting). On réalise alors une révélation immunochimique spécifique.

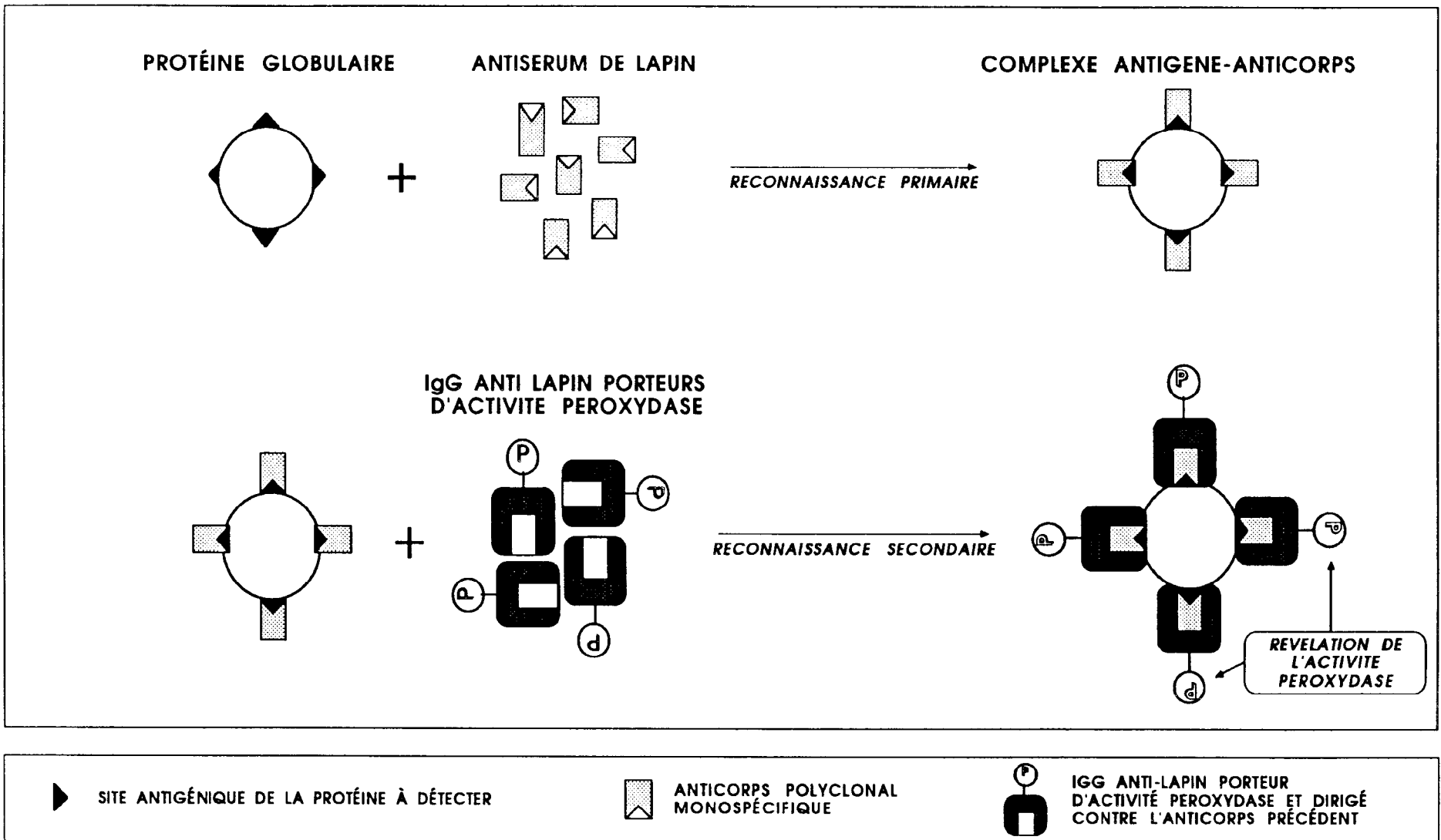
La technique des immunoempreintes fait appel au même principe de révélation que les tests ELISA. On effectue, sur les protéines antigéniques à identifier, une fixation, secondaires d'anticorps porteurs d'une activité aisément visualisable, ou quantifiable en spectrophotométrie (péroxydases, phosphatases).

b) Electrotransfert : ou *Western blotting*

Les extraits enzymatiques à révéler subissent, dans un premier temps, une électrophorèse de type SDS PAGE suivant le protocole précédemment décrit.

En vue de révélations immunochimiques, on réalise un électrotransfert des protéines du gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose, en les soumettant à un champ électrique au travers d'un "sandwich" (système "Lagon"-BIORAD).

Figure n° 25 : FIXATION SECONDAIRE D'ANTICORPS MARQUÉS :



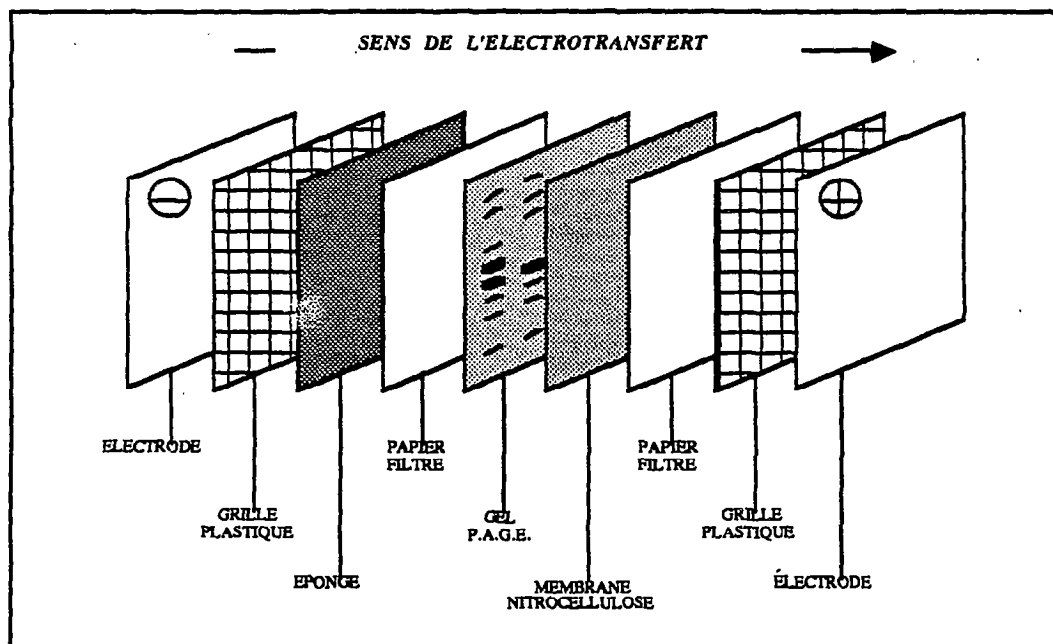


Figure n° 24 : Schéma de l'électrotransfert après électrophorèse sur système BIORAD "Lagon"

Le transfert s'effectue à 40 Volts (350 mA) pendant 6 heures, à 4-8°C. (La cuve de transfert est thermostatée). L'efficacité de l'électrotransfert est vérifiée visuellement par le passage sur la membrane des marqueurs de poids moléculaire colorés.

On peut compléter cette observation par une coloration du gel de polyacrylamide au Bleu de Coomassie, qui doit révéler une absence totale de protéines après transfert.

Une fois l'électrotransfert réalisé, la membrane de nitrocellulose est saturée en protéines, afin d'éviter une fixation ultérieure des anticorps, à l'aide d'une solution de Sérum Albumine Bovine (5% dans du tampon Tris 0,1 M ; pH = 7,6 + 0,05% de Tween 20). Après saturation, la membrane est rincée plusieurs fois avec du tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 7,6).

c) Révélation immunochimique spécifique : (voir la figure n° 25)

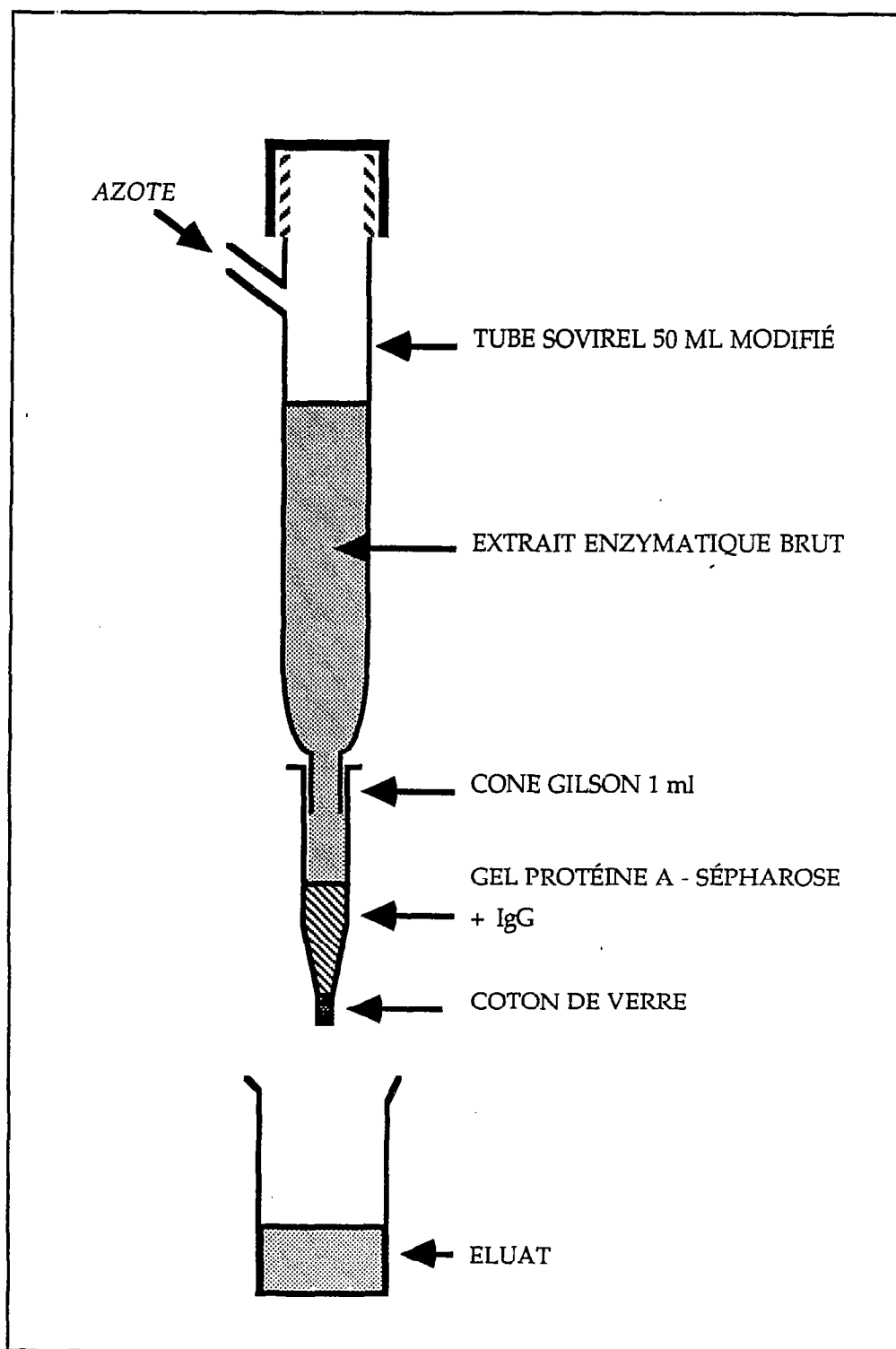
La membrane est ensuite mise en contact par trempage avec une solution d'antisérum monospécifique de lapin dirigée contre la protéine végétale à détecter (RubP Carboxylase, par exemple). On réalise une solution d'anticorps (150 µl d'antisérum dans 20 ml de tampon Tris 0,1M ; pH = 7,6), dans laquelle est mise à tremper la membrane. L'incubation se poursuit durant 12 heures à 4°C, ou 5 heures à 20°C.

Une deuxième incubation est ensuite effectuée à l'aide d'anticorps IgG du commerce, (anti-lapin ou anti-souris, suivant l'animal immunisé contre la protéine végétale à révéler), porteur d'une activité peroxydasique.

On utilise 60 à 100 µl de solution d'IgG marqués à la peroxydase pour 20 ml de tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 7,6). Les conditions de l'incubation ont été précédemment décrites.

Les bandes électrophorétiques porteuses d'activité peroxydasique sont révélées par l'action d'une solution de chloronaphtol (Voir Annexe B; § : 3). Le chloronaphtol est utilisé de préférence à la diaminobenzidine, à risque cancérigène. La coloration est très instable, et nécessite la prise immédiate de clichés photographiques ou de photocopies.

Figure n° 26 : Schéma d'une mini-colonne d'immunosélection



Les tests ELISA font appel au même principe de révélation, à l'aide d'anticorps porteurs d'une activité enzymatique aisément quantifiable en spectrophotométrie (péroxydases, phosphatases). Cette méthode, récemment appliquée aux enzymes végétales, donne des estimations quantitatives satisfaisantes, utilisables pour la titration en série d'un grand nombre d'échantillons. Ainsi, plusieurs auteurs ont mis au point des méthodes de dosage pondéraux de la Nitrate Réductase (CAMPBELL & RIPP - 1984, MAKI & coll. - 1986) et de la Rubisco (CATT & MILLARD - 1988).

D'autres types de révélations par fixation secondaire d'IgG marqués peuvent être utilisés. Pour la Nitrate Réductase, l'emploi d'anticorps anti-lapin marqués à l'Iode 125 permet, après autoradiographie, une mise en évidence optimale des bandes caractéristiques de la protéine, avec une résolution très supérieure aux autres systèmes (coloration au nitrate d'argent ou au Bleu de Coomassie).

6) Techniques d'immunosélection : ou chromatographie d'immunoaffinité :

a) Principe :

Les anticorps spécifiques d'une protéine enzymatique sont fixés sur un gel d'agarose par l'intermédiaire de la Protéine A. On élue l'extrait enzymatique sur une colonne de ce gel, afin d'y fixer spécifiquement l'enzyme.

b) Protocole expérimental : (voir la figure n° 26)

On réalise une **colonne d'immunoaffinité** à l'aide d'un gel de **Protéine A-Sépharose** (Sigma). Ce gel est mis en présence (12 heures - 4°C) d'une solution d'anticorps de lapin dirigés contre une protéine végétale, dans du tampon Phosphate 50 mM (pH = 7,0). On incube ainsi 50 à 70 µl de solution d'IgG avec 100 µl de gel. Les IgG se fixent alors sur la protéine A. (Cette fixation n'est effective qu'avec des IgG de lapin). Un bon contact IgG/Protéine A doit être assuré par agitation continue.

On dispose alors le gel sur une mini-colonne d'immunosélection :

On place un peu de coton de verre au fond d'un embout pour micropipette GILSON de 1 ml, puis on y coule le gel (100 µl environ). La colonne est alors rincée avec 20 ml de tampon Phosphate 50 mM (pH = 7,0) afin d'éliminer les anticorps en excès. On peut vérifier, par coloration de SEDMAK & GROSSBERG (1977), l'absence de protéines solubles dans l'éluat.

L'extrait enzymatique est ensuite déposé en tête de colonne, à pression atmosphérique ou sous flux d'Azote, afin d'assurer un goutte à goutte régulier. La réaction de fixation Antigène-Anticorps est instantanée à 20°C. Les IgG fixent spécifiquement sur la colonne leur protéine antigénique.

Lorsque la totalité de l'extrait est éluee, la colonne est rincée avec 20 ml de tampon Phosphate 50 mM (pH = 7) contenant du Na Cl à 9 %. On effectue ensuite un deuxième rinçage avec le même volume de tampon Tris-HCl 50 mM (pH = 7,0), car l'utilisation de tampon Phosphate est incompatible avec d'éventuelles électrophorèse sur gel de polyacrylamide, postérieures à l'immunosélection.

Le gel (mélange Sépharose + Protéine A + IgG + Antigène) est récupéré en découpant l'embout au scalpel.

Le gel est ensuite soumis à une dénaturation (voir le § : Techniques d'électrophorèse). Les protéines dénaturées sont ensuite séparées par électrophorèse SDS PAGE.

Après la migration, une révélation au Bleu de Coomassie montre les bandes caractéristiques :

- de la Protéine A (dissociée du gel)
- des anticorps IgG (2 sous-unités)
- de la protéine antigénique. (NATO & VIDAL , 1983)

Nota : Il est possible de "décrocher" le complexe antigène/anticorps du gel par élution avec un tampon Acide acétique/acétate de Na 50 mM (pH = 2,8). On recueille alors l'éluat dans du tampon Tris-HCl 100 mM (pH = 7) pour le neutraliser rapidement et éviter ainsi une dénaturation définitive de l'antigène. DAUSSANT & SKAKOUN (1985) suggèrent l'emploi d'ions chaotropiques, ou d'urée. Des conditions permettant une désorption non dénaturante ont été proposées, qui sont susceptibles de généralisation : solutions hypotoniques, eau distillée... (BUREAU & DAUSSANT - 1981)

La chromatographie d'immunoaffinité est d'une grande utilité pour éliminer d'un extrait enzymatique un contaminant connu: (par exemple : Rubisco/PEP Case). Elle peut être utilisée en routine pour parfaire la purification d'une préparation antigénique, avant immunisation de l'animal de laboratoire.

Lors de l'incorporation par des suspensions cellulaires de ³⁵S méthionine, nous avons pu, grâce à cette technique d'immunosélection, mettre en évidence l'incorporation de radioactivité spécifiquement dans quelques systèmes enzymatiques.

F) MICROSCOPIE OPTIQUE & ELECTRONIQUE :

1) Microscopie optique :

Les suspensions cellulaires sont observés sur une lame porte objet à l'aide d'un microscope optique inversé de marque Leitz (modèle : DIAVERT), équipé d'une chambre photographique 24 x 36 mm WILD.

2) Microscopie électronique :

a) fixation des échantillons : d'après REYNOLDS (1963) & SPURR (1969).

1) **Préinclusion des cals** (ou des suspensions cellulaires filtrées sous vide) dans la gélose à 2 %. La gélose est dissoute dans un tube à essai, puis coulée dans une boîte de Pétri en verre. Les fragments végétaux y sont alors inclus, puis découpés en cubes de 1 mm de côté environ.

2) **Fixation** (12 à 24 h) dans le glutaraldéhyde :

La solution de glutaraldéhyde est préparée à 3 % final dans du tampon cacodylate dilué 2 fois :

- 10 ml de solution aqueuse 25 % de glutaraldéhyde (SIGMA G 5882)
- 42 ml de tampon cacodylate pH 7,2. (8 g de cacodylate de Na dans 500 ml d'H₂O bidistillée).
- 32 ml de H₂O bidistillée.

Les échantillons sont placés dans des piluliers obturés par une fine toile de nylon de type Blutex (36μ).

3) **Rinçage** (3 bains de 20 mn à 1 heure) dans le tampon cacodylate pH 7,2.

4) **Post-fixation** dans l'acide osmique OsO₄ à 1% (w/v) durant 2 heures.

Solution d'acide osmique 1 % :

- 1g d'acide osmique solide OsO₄ dans 50 ml d'H₂O bidistillée + 50 ml de tampon véronal.

Préparation du tampon véronal : 1 volume de solution acétique + 1 volume de solution de diéthylmalonylurée + 2 volumes d'H₂O bidistillée.

- solution acétique 0,14 M : 1,90 g d'acétate de sodium dans 100 ml d'H₂O bidistillée.
- solution véronal 0,14M : 2,58g de véronal sodique dans 100 ml d'H₂O bidistillée.

5) **Rinçage** : 3 bains de 20 minutes dans de l'eau bidistillée.

6) **Déshydratations successives** dans l'éthanol 10°, 20°, 30°, 50°, 70°, 80°, 95°, 100°.

La durée de chaque bain est de 20 minutes à 1 heure.

Les échantillons peuvent être conservés en cours de fixation dans l'éthanol 70°.

7) **Ethanol 100°** (3 bains de 20 minutes à 1 heure chacun)

b) inclusion des échantillons :

Elle s'effectue dans la résine de SPURR (1969) suivant le protocole suivant :

1) Mélange (50/50) éthanol 100/oxyde de propylène : 1 bain de 20 minutes

2) Oxyde de propylène pur : 3 bains de 20 minutes chacun

3) Mélange oxyde de propylène/ résine de SPURR* : 24 heures chacun

- 1 bain de mélange oxyde de propylène/Spurr : 2/3-1/3 (v/v)

- 1 bain de mélange oxyde de propylène/Spurr : 1/3-2/3 (v/v)

4) Résine de SPURR pure : 2 bains de 2 heures à 24 heures chacun

5) Inclusion définitive à la résine de SPURR : dans des moules plastiques adéquats (fab. LADD, Réf n° 21775). Les échantillons coulés dans des moules sont mis à sécher à l'étuve (70°C) durant 8 heures, afin de parfaire la solidification de la résine.

** Préparation de la résine de SPURR (1969) :*

On mélange dans l'ordre :

- Vinyl cyclohexane dioxide (ERL 4206) : 10 g.

- Diglycidyl ether of propylene glycol (DER 736) : 6 g.

- Nonenyl succinic anhydride (NSA) : 26 g.

- Diéthylaminoéthanol (S1-Accélérateur) : 0,4 g.

Ces produits sont fabriqués par TAAB Lab. (England) et distribués par EURO BIO

c) Préparation des coupes microscopiques :

Les coupes microscopiques ont été réalisées au service Commun de Microscopie Electronique de l'U.S.T.L. Montpellier. Elles ont été effectuées à l'aide d'un ultramicrotome REICHTER Om U2.

d) Observations microscopiques :

Elles sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique à transmission de marque : JEOL (Type JEM 100B). Des photographies noir et blanc sont effectuées pour chaque observation.

3) Analyses d'images :

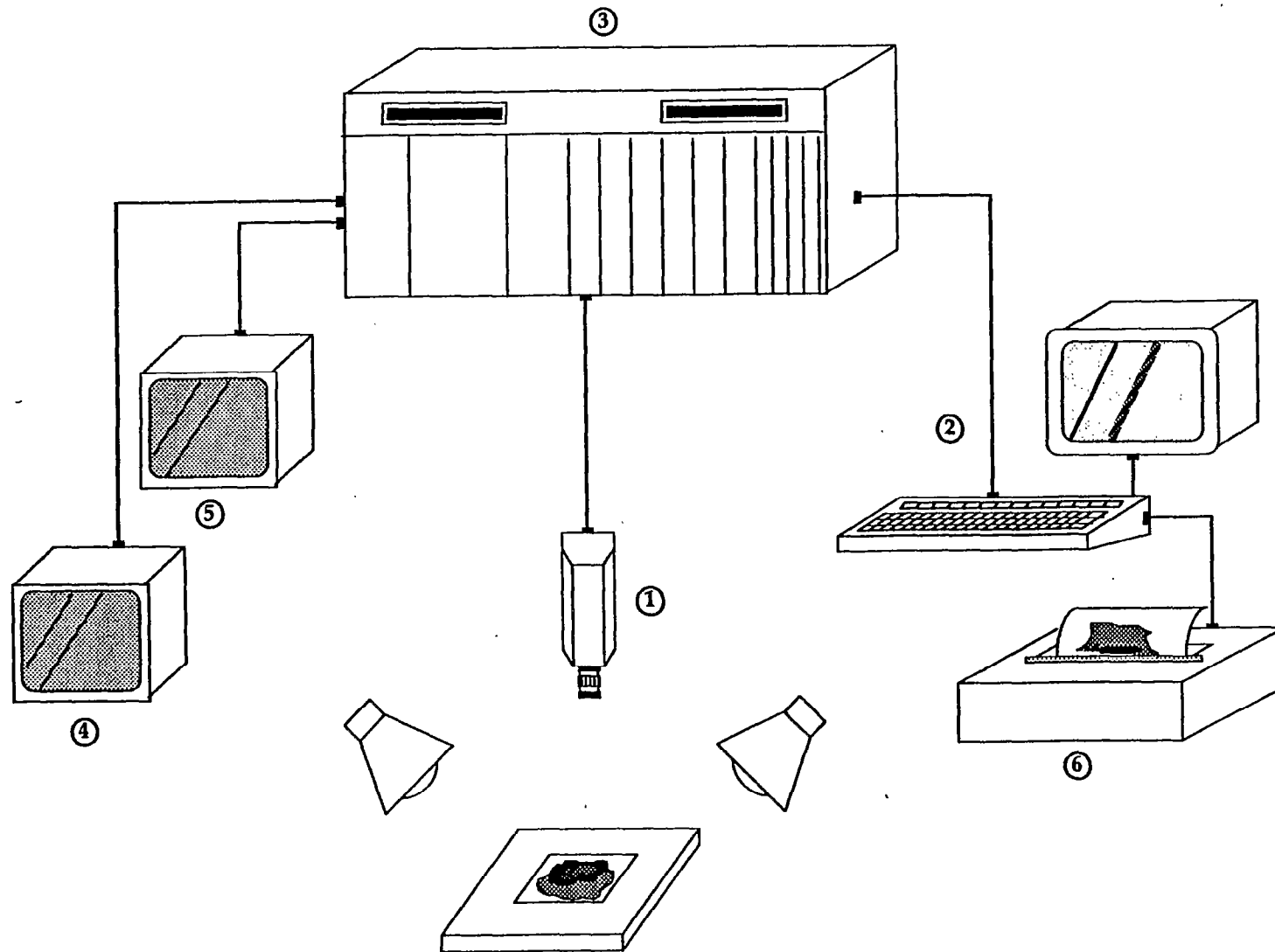
(Elles ont été réalisées grâce à la collaboration de Mr C.E. GRIL au Service Commun de Microscopie Electronique de l'U.S.T.L. Montpellier)

Les tirages photographiques noir et blanc obtenus en microscopie électronique sont analysés à l'aide d'un système informatique de marque DATA SYSTEMES. Le développement du matériel et du logiciel a été assuré par Mr GRIL (S.M.E. /U.S.T.L.)

a) Principe :

L'analyse consiste à faire l'acquisition d'une image en la numérisant. Celle-ci est décomposée en 512 x 512 points (Pixels) ayant chacun une valeur de gris comprise entre 0 (pour le noir) et 255 (pour le blanc). Un niveau de gris représente une température T, et deux niveaux de gris consécutifs sont séparés par une fraction de degré.

Figure n° 27 : SCHEMA DE L' ANALYSEUR D'IMAGES



1 Camera vidéo CCD Haute résolution
2 Micro-ordinateur: moniteur & clavier
3 Unité centrale informatique

4 Ecran vidéo Noir & Blanc
5 Ecran vidéo Couleur
6 Imprimante

L'image en noir et blanc obtenue est alors colorée en fausse couleur en attribuant à chaque niveau de gris une couleur différente choisie dans une palette de 16 millions de tons (obtenus par la combinaison des trois couleurs fondamentales: bleu, vert, rouge).

b) Matériel : (Figure n° 27)

L'analyseur d'images est composé d'une caméra CCD Haute Résolution (Panasonic WW CD 20), d'un moniteur de micro-ordinateur relié à une unité centrale puissante. Cette unité est équipée de deux écrans vidéo (noir et blanc et couleur) pour l'observation des images acquises, puis traitées. Une imprimante permet de visualiser l'analyse.

Pour les besoins de notre étude, nous avons réalisé une série de prises de vue photographiques directement sur l'écran vidéo couleur.

CHAPITRE 3

RESULTATS & DISCUSSIONS

A) ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES DE CULTURE SUR DES CALS DE PROLIFERATION D'ABRUS PRECATORIUS CULTIVES EN PHOTOMIXOTROPHIE :

L'établissement d'un soucier statique stable et abondant constitue un préalable indispensable à la suite de notre étude. Ce soucier assure la pérennité de notre matériel végétal, la matière première pour la création de suspensions cellulaires, ainsi que la fourniture en biomasse nécessaire à la mise au point de diverses techniques d'analyse (enzymologie, métabolites secondaires...)

Nota : Ces résultats ont été obtenus grâce à des expérimentations menées en collaboration avec I. HARDY -CLARIS (1988) & F. GALLE (1988).

L'étude de la croissance des cals photomixotrophes a été réalisée sur la lignée 6H. La souche avait subi, au moment de cette étude, 43 repiquages sur le milieu de base M.&S. (voir le tableau n° : 5) contenant 15 g. l⁻¹ de saccharose. Les cals de prolifération âgés de 3 semaines sont fractionnés, et les fragments les plus chlorophylliens servent d'inoculum. Ils sont disposés régulièrement sur 80 ml de milieu gélosé, dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml. Cinq cals représentant une masse totale de 130 mg_{PMF} (+/- 48) sont déposés dans chaque fiole. Les conditions de culture ont été décrites précédemment.

Une fiole est prélevée tous les deux jours afin d'évaluer plusieurs paramètres (biomasse, chlorophylle...). Les cinq cals sont pesés, essuyés, et la biomasse totale contenue dans l'erlen est prise en compte pour estimer la croissance. Trois des cinq cals sont déshydratés afin d'estimer le poids de matière sèche. Les deux cals restants sont utilisés pour la détermination des chlorophylles totales.

1) Evolution de la biomasse : (Figure n° 28)

La biomasse des cals suit une croissance régulière, sans phase de latence en début de culture. En 22 jours, le poids de matière fraîche, exprimé par fiole, est multiplié par 20. La courbe de croissance ne montre pas de phase de ralentissement en fin de culture, aucun facteur limitant ne semble donc intervenir à cette date. (fig. n° 28-A). La masse de matière fraîche des cals suit une courbe de **croissance exponentielle** tout au long du cycle de culture. En effet, l'expression de la biomasse fraîche en coordonnées semi-logarithmiques suit, avec une excellente corrélation ($r = 0,99$) une évolution linéaire en fonction du temps durant toute la durée du cycle. (fig. n° 28-B)

Les cals restent friables durant toute la culture, avec une teneur en eau importante, comprise entre 92 et 95 %. (fig n° 28 -C)

Ce caractère est primordial : il permet d'obtenir aisément, sans dissociation chimique ou enzymatique, des suspensions cellulaires fines et homogènes.

2) Evolution de la teneur en chlorophylles totales :

La figure n° 29 présente l'évolution de la teneur en chlorophylles totales (a+b). Exprimée par mg de matière sèche, cette teneur chute au cours des premiers jours de la culture (0 à 4 jours) pour croître ensuite jusqu'au 8^e, se stabiliser (8 à 18 jours), et enfin décroître en fin de cycle. Cette courbe reflète, plus précisément, l'intensité de la biosynthèse en pigment. Au cours des premiers jours de culture, on observe une croissance active, et une chlorophyllogénèse faible.

Cet antagonisme entre élaboration active de biomasse et chlorophyllogénèse a été notée par plusieurs auteurs (DAVEY *et al.* - 1971 ; DALTON & STREET - 1976 ; NATO *et al.* - 1977 ; HARDY - 1984). Il est cependant nécessaire de faire clairement la part entre les effets de la croissance proprement dite, et ceux des multiples facteurs externes qui l'accompagnent : modifications de l'environnement gazeux, de la teneur en saccharose,...

EVOLUTION DE LA BIOMASSE
Cals photomixotrophes d'Abrus . Lignée 6H

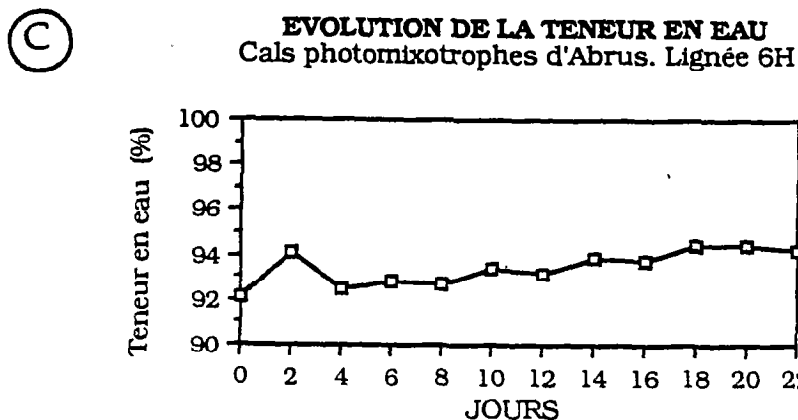
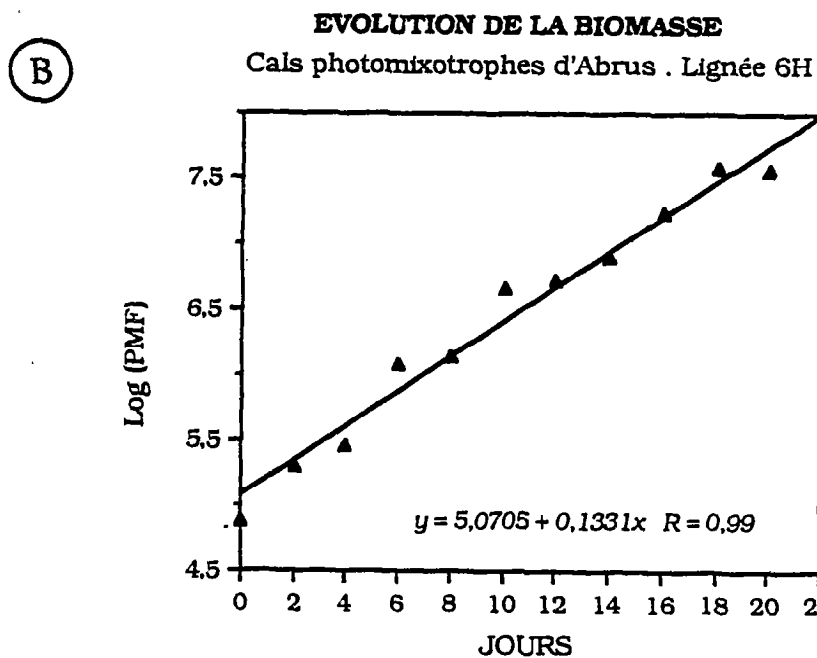
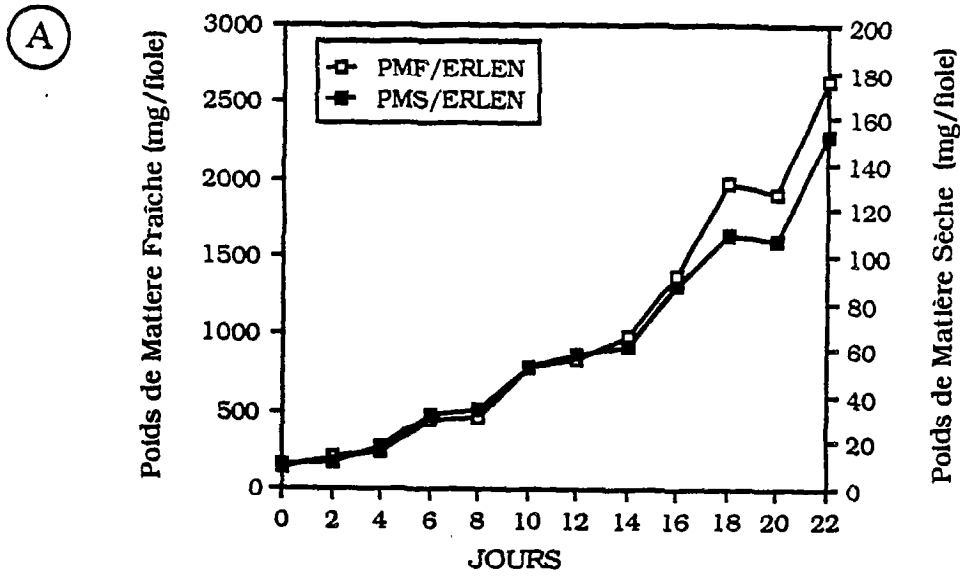


Figure n° 28 : Evolution de la biomasse dans une culture de cals photomixotrophes

Figure n°: 29

EVOLUTION DES CHLOROPHYLLES TOTALES

Cals photomixotrophes d'Abrus . Lignée 6H

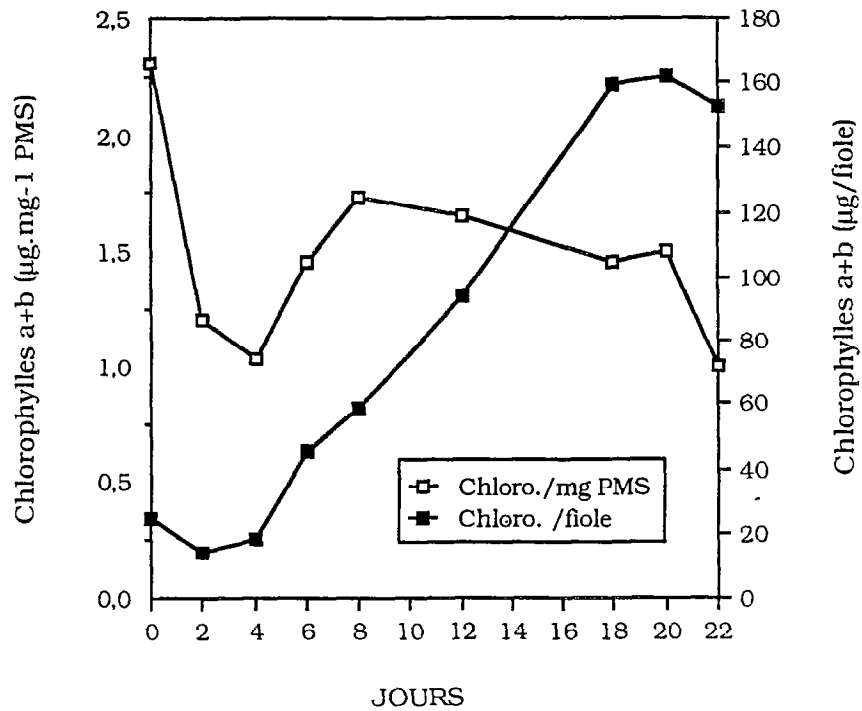
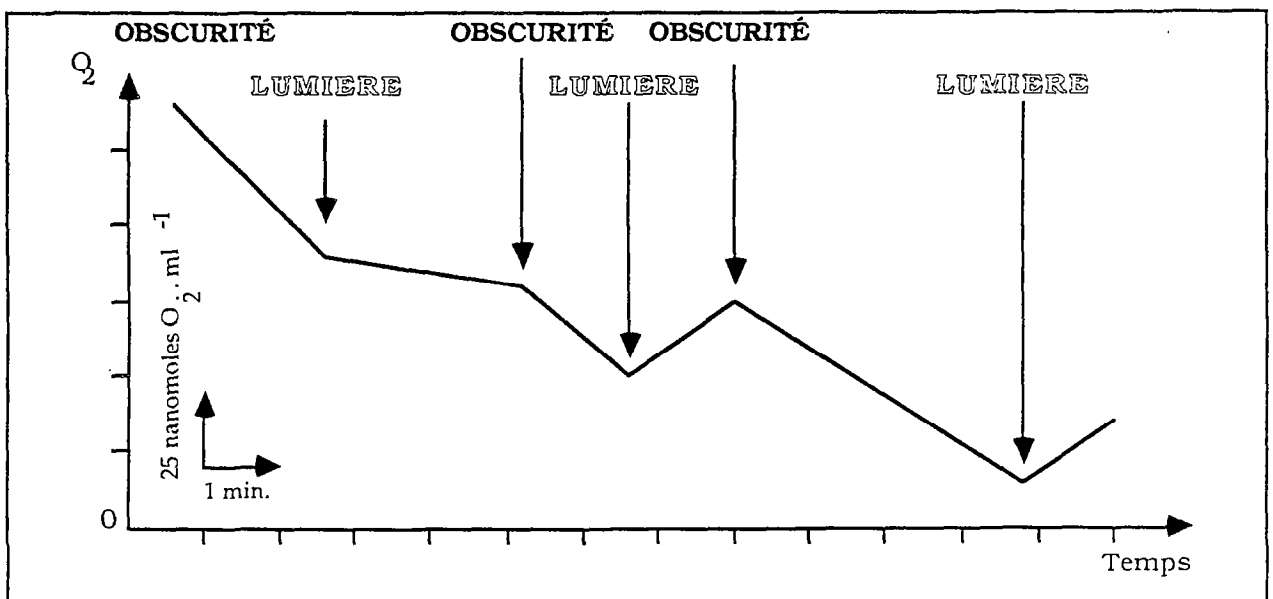


Figure n° 30

ENREGISTREMENT DES ECHANGES D'OXYGENE MESURÉS À L'ELECTRODE DE CLARK

Cals photomixotrophes d'Abrus . Lignée 6H . Age: 21 jours



Par contre, si l'on exprime la quantité de chlorophylles en microgramme par fiole, on met en évidence une toute autre évolution. Ici, c'est la **résultante** des phénomènes de croissance en biomasse et de chlorophyllogénèse qui est considérée. La quantité de pigments reste stable durant les premiers jours de culture (0 à 4 jours), puis augmente très nettement ($\times 8,5$) jusqu'au 18^e jour. A la fin du cycle, on remarque une chute nette du taux de chlorophylles, signe de l'évolution de la suspension vers un état sénescence.

Il apparaît ici nettement que le critère à retenir pour établir la fréquence de repiquage des cals n'est pas le ralentissement de la croissance, mais celui de la chlorophyllogénèse. Notre but est de sélectionner des cals exprimant une synthèse active en pigments chlorophylliens, liée à une capacité photosynthétique importante.

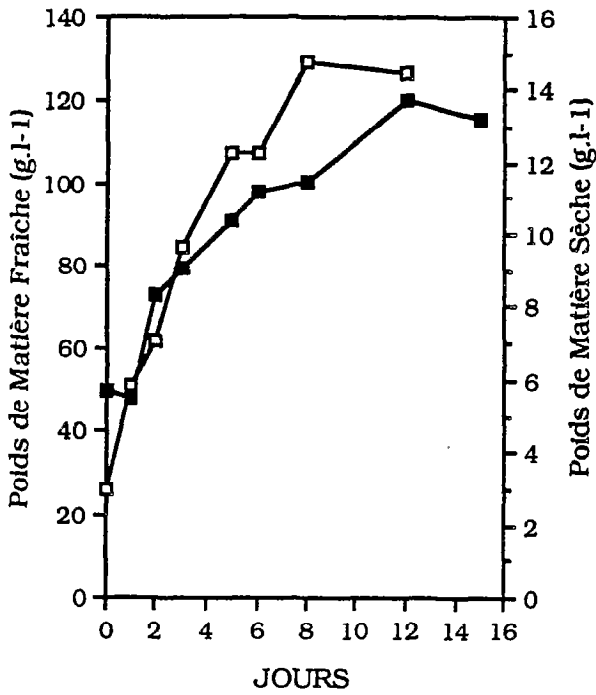
Nous avons régulièrement repiqué ces cals tous les 20 jours environ, en éliminant, lors de chaque passage, les parties dépigmentées ou nécrosées.

3) Mise en évidence d'une photosynthèse nette :

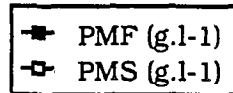
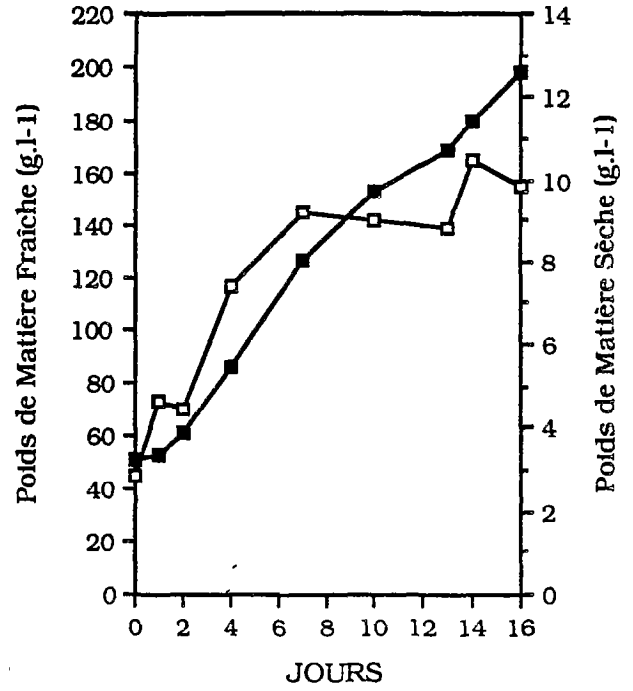
L'enregistrement présenté ci-contre (figure n° 30) décrit les échanges d'oxygène mesurés à l'électrode de Clark pour des cals chlorophylliens récoltés en fin de culture (3 semaines). Une photosynthèse nette peut être clairement mise en évidence. Son intensité dépend du taux d'oxygène dissous présent dans la cuve de mesure au moment de l'éclairement. Ce type de cals potentiellement autotrophe, chlorophyllien et friable sera utilisé comme inoculum afin d'obtenir des suspensions cellulaires.

Nota : Notre souchier de cals hétérotrophes n'a pas fait l'objet d'une caractérisation précise. Il a été entretenu dans le but de conserver un matériel végétal hétérotrophe de référence pour des études ultérieures (obtention de suspensions hétérotrophes, enzymologie, dosage éventuels de métabolites secondaires...)

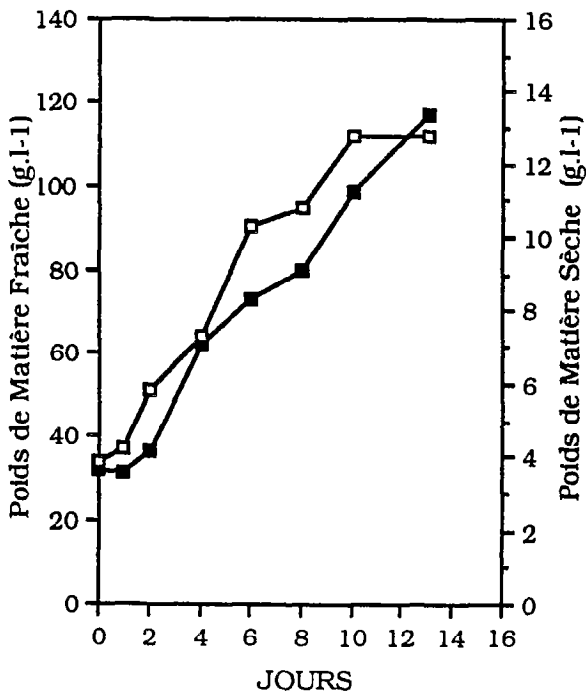
EVOLUTION DE LA BIOMASSE
Suspension hétérotrophe en fiole



EVOLUTION DE LA BIOMASSE
Suspension photomixotrophe en fioles



EVOLUTION DE LA BIOMASSE
Suspension hétérotrophe en bioréacteur



EVOLUTION DE LA BIOMASSE
Suspension photomixotrophe en bioréacteur

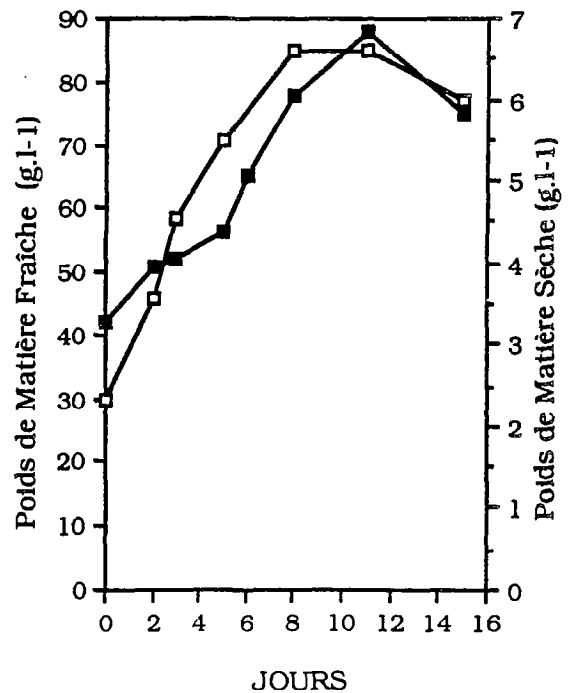


Figure n° 31: Evolution de la biomasse (P.M. F. & P.M.S.) dans les quatre types de cultures cellulaires étudiés.

B) ETUDE CINETIQUE DE DIFFERENTS PARAMETRES DE CULTURE SUR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES HETERO & PHOTOMIXOTROPHES CULTIVEES EN FIOLES OU EN BIOREACTEUR AERE :

Nota : Les résultats présentés dans ce paragraphe, qui concernent la caractérisation de la lignée 6H d' Abrus precatorius, cultivée en suspension cellulaire, ont été obtenus conjointement avec I. HARDY-CLARIS (1988).

L'ensemble de nos résultats sera présenté dans les paragraphes suivants sous la forme de graphiques groupant les quatre cultures cellulaires réalisées. Chaque étude cinétique concerne les résultats d'un cycle de culture unique, sur laquelle ont été étudiés les mêmes paramètres. Le temps imparti à cette étude, et l'abondance des paramètres étudiés ne nous ont pas permis de faire un nombre important de cultures de chaque type.

Nous avons choisi de présenter, pour chacun des quatre cas, la culture la plus représentative, pour laquelle l'ensemble des paramètres présentés a pu être étudié. Il sera précisé, chaque fois que cela est nécessaire, si il a été fait appel aux résultats concernant une autre culture.

1) Evolution de la biomasse : (Figure n° 31)

Pour les quatre types de cultures présentées, les courbes de croissances (exprimées par rapport au PMF) présentent, en début de cycle, une phase de latence nulle ou de courte durée (un jour au maximum). Une phase de croissance accélérée commence dès les premiers jours suivant le repiquage.

Si l'on compare la croissance en matière fraîche et en matière sèche des suspensions, on peut discerner, dans tous les cas présentés, une évolution semblable : le PMS croît beaucoup plus rapidement que le PMF durant la phase exponentielle, puis cette tendance s'inverse en fin de culture.

Ces données confirment les résultats de nombreux auteurs qui ont mis en évidence deux phases distinctes dans la croissance de suspensions cellulaires *in vitro* : une phase de prolifération rapide (mérésis) des cellules, suivie d'une phase de grandissement cellulaire (auxesis). (MOHANTY & FLETCHER - 1978)

Diverses équipes ont étudié l'évolution de l'index mitotique (I.M.) en cours de culture : elles ont ainsi mis en évidence une augmentation concomitante de l'I.M. et de la biomasse durant la phase exponentielle de croissance (TORREY *et al.* 1962, HENSHAW *et al.* -1965). Ainsi, l'index mitotique passe de 0 à 4% de la population cellulaire entre l'inoculation et le 4^e jour dans une suspension de *Silene alba*. De plus, la taille moyenne des cellules varie en sens inverse de l'I.M. et de la densité cellulaire sur ce même matériel (DUBOIS *et al.* -1976)

En outre, THOM *et al.* (1981) décrivent, sur une suspension cellulaire de canne à sucre, une augmentation nette du volume relatif de la vacuole (de 62 à 71% du volume cellulaire total) au cours de la phase stationnaire.

Concernant la présente étude, des mesures de taille moyenne des cellules auraient sans doute permis de confirmer cette hypothèse sur notre matériel végétal.

Le tableau ci- dessous permet de comparer quelques caractéristiques de la croissance, établies par rapport au poids de matière sèche, pour les quatre types de cultures étudiées :

	culture hétérotrophe en fiole	culture mixotrophe en fiole	culture hétérotrophe en bioréacteur	culture mixotrophe en bioréacteur
Taux de croissance : μ (heure ⁻¹)	5,8.10 ⁻³	10.10 ⁻³	6,6.10 ⁻³	5,8.10 ⁻³
Temps de doublement: Td (heure)	100	84	108	100
Facteur de multiplication de la biomasse	x 4,8	x 3,2	x 3,2	x 2,8
Productivité en biomasse (g. PMS. jour ⁻¹ . litre ⁻¹)	0,95	0,55	0,70	0,53

Tableau n° 7 : Comparaison des paramètres de croissance calculés sur différents types de culture

- Suspension hétérotrophe en fioles :

Dans ce cas, l'accroissement en matière sèche ne marque pas de temps de latence, et la biomasse sèche ne commence à croître qu'après 24 heures de culture.

C'est le type de culture pour lequel l'accroissement en poids de matière sèche et la productivité en biomasse sont le plus élevés. La teneur en eau des cellules reste inférieure à 90% pendant tout le cycle de culture. Cette valeur relativement faible peut s'expliquer par la morphologie même de la suspension : les cellules hétérotrophes sont groupées en microcals compacts de 1 à 3 mm de diamètre.

D'autre part, la forte teneur en saccharose interne mesurée sur ces cultures par HARDY-CLARIS (1988) peut également expliquer ce rapport PMS/PMF plus important.

MERILLON *et al.* (1983) proposent la même explication pour des suspensions cellulaires hétérotrophes de *Catharanthus roseus*.

La phase exponentielle de croissance dure 5 jours, puis se ralentit. La biomasse reste stationnaire à partir du 8^e jour. Les poids de matière fraîche (PMF) et de matière sèche (PMS) suivent une évolution comparable.

- Suspension photomixotrophe en fioles :

La courbe d'évolution de la biomasse ne montre pas de phase de latence, les conditions d'entretien de la lignée ayant été fixées dans ce but. La culture croît exponentiellement durant 7 jours (si l'on suit le poids de matière sèche), puis se stabilise. Par contre, la biomasse fraîche de la culture suit une augmentation constante durant tout le cycle de culture.

Cette évolution est semblable à celle décrite par DUBOIS (1975) sur une suspension cellulaire de *Silene alba* cultivée en fioles à la lumière.

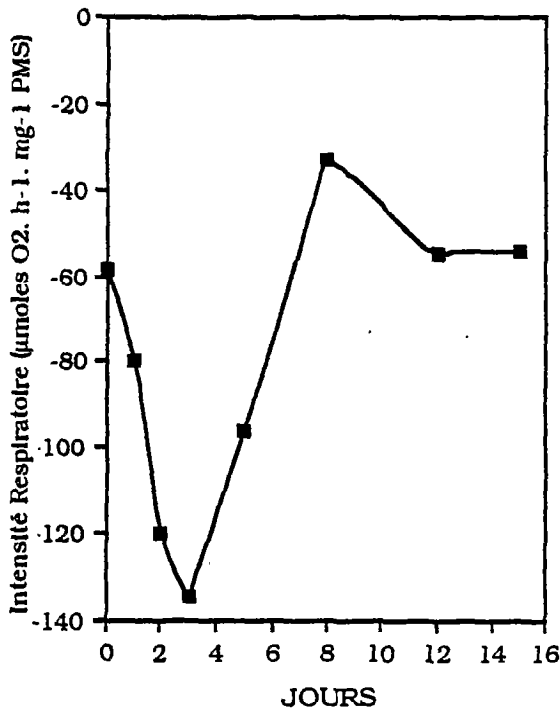
L'arrêt de l'accroissement en matière sèche est compensé, en fin de culture, par un enrichissement en eau des cellules, vraisemblablement par grandissement cellulaire. Ce type de cellules présente un Temps de doublement très long (5 jours) et un accroissement en biomasse le plus faible des quatre cas étudiés.

- Suspension hétérotrophe en bioréacteur :

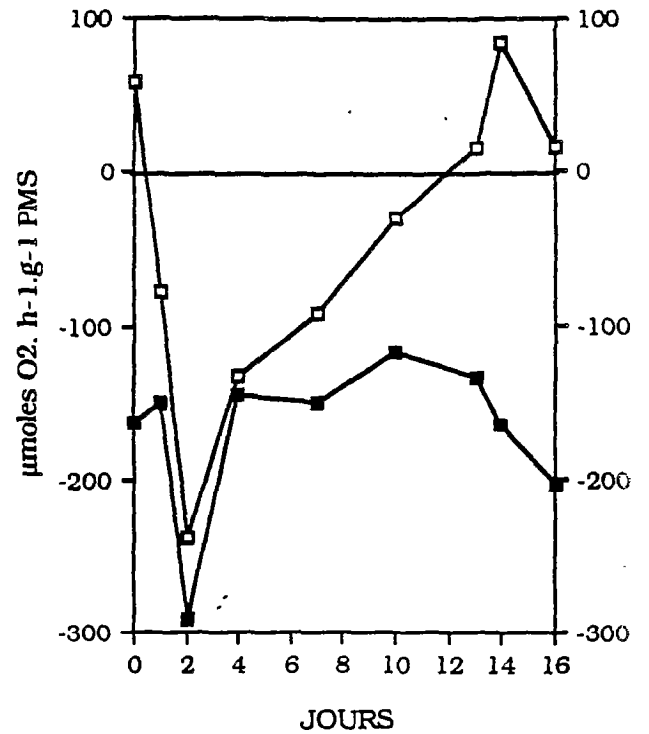
L'évolution du poids de matière sèche fait apparaître une phase de croissance exponentielle qui se poursuit jusqu'au 6^e jour, après une courte phase de latence d'un jour. La croissance en biomasse (PMS) se ralentit (6-10 jours) puis reste constante à partir du 10^e jour. Le poids de matière fraîche croît linéairement tout au long du cycle. La

EVOLUTION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE

Suspension hétérotrophe en fioles

**EVOLUTION DES ECHANGES D'OXYGENE**

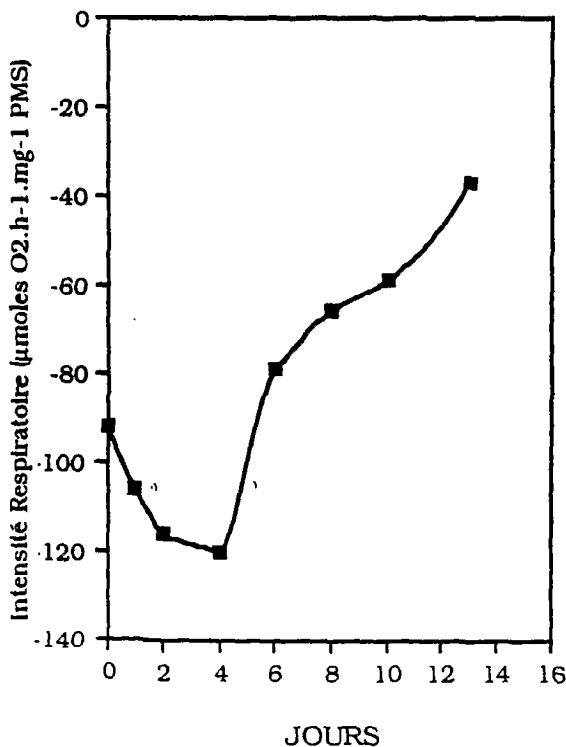
Suspension photomixotrophe en fiole



□ O₂ lumière
■ O₂ obscurité

EVOLUTION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE

Suspension hétérotrophe en bioréacteur

**EVOLUTION DES ECHANGES D'OXYGENE**

Suspension photomixotrophe en bioréacteur

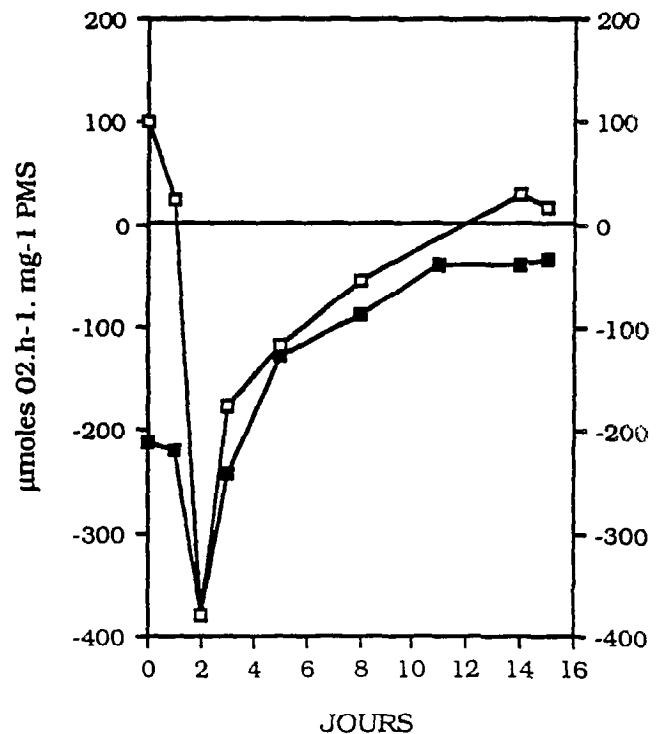


Figure n° 32 : Evolution de l'intensité respiratoire et de la photosynthèse dans les quatre types de cultures cellulaires étudiés.

suspension présente, comme lors de la culture en fioles, une teneur en eau inférieure à 90 %.

- Suspension photomixotrophe en bioréacteur :

La reprise de croissance, lors du transfert des cellules en bioréacteur, s'effectue sans phase de latence. Le PMS suit, dès l'ensemencement, une croissance exponentielle, qui se poursuit durant les trois premiers jours de culture. Une croissance active de la population se prolonge jusqu'au jour 8. La biomasse fraîche évolue linéairement durant 11 jours, puis décroît légèrement en fin de cycle. La teneur en eau des cellules est supérieure à 90% tout au long de la culture.

Les taux de croissances mesurés sur notre matériel végétal sont du même ordre que ceux décrits dans la littérature :

Ainsi, VELIKY & MARTIN (1970) obtiennent, pour des suspensions cellulaires hétérotrophes de *Phaseolus vulgaris* un taux de croissance maximum μ_{MAX} de $11 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ avec un temps de doublement de 84 heures. Sur une lignée hétérotrophe de *Medicago sativa*, PAREILLEUX & CHAUBET (1980) rapportent un μ_{MAX} de $12 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

N. LAMBERT (1989) mesure, sur des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* un taux de croissance maximal de l'ordre de $14 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

2) Evolution des échanges gazeux : (Figure n° 32)

a) Evolution de la respiration :

Pour tous les types de culture, l'intensité respiratoire montre un pic très marqué lors de la phase exponentielle de croissance (2°-4° jour de culture). Les intensités respiratoires maximales exprimées par rapport au poids de matière sèche sont plus importantes (x 2 environ) pour les suspensions photomixotrophes aussi bien en réacteur qu'en fioles. Ces différences sont dues à une teneur en eau beaucoup plus faible chez les cellules hétérotrophes. En effet, une fois ramenées au poids de matière fraîche, les intensités respiratoires présentent des valeurs comparables.

Chez les cellules hétérotrophes, ce pic est plus tardif (48 h) que chez les cellules photomixotrophes (24 h). L'intensité respiratoire maximale atteint $130 \mu\text{moles O}_2 \text{ consommées} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ PMS}$ environ, en fioles comme en bioréacteur. Lors de cultures en fioles, l'intensité respiratoire retrouve sa valeur initiale au bout de 6 jours. En bioréacteur, l'IR retrouve sa valeur initiale, puis le métabolisme respiratoire faiblit en fin de culture.

Dans le cas des cultures photomixotrophes, la respiration cellulaire atteint, après 48 heures de culture, une valeur maximale de 300 (cultures en fioles) et $380 \mu\text{moles O}_2 \text{ consommées} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ PMS}$ (bioréacteur).

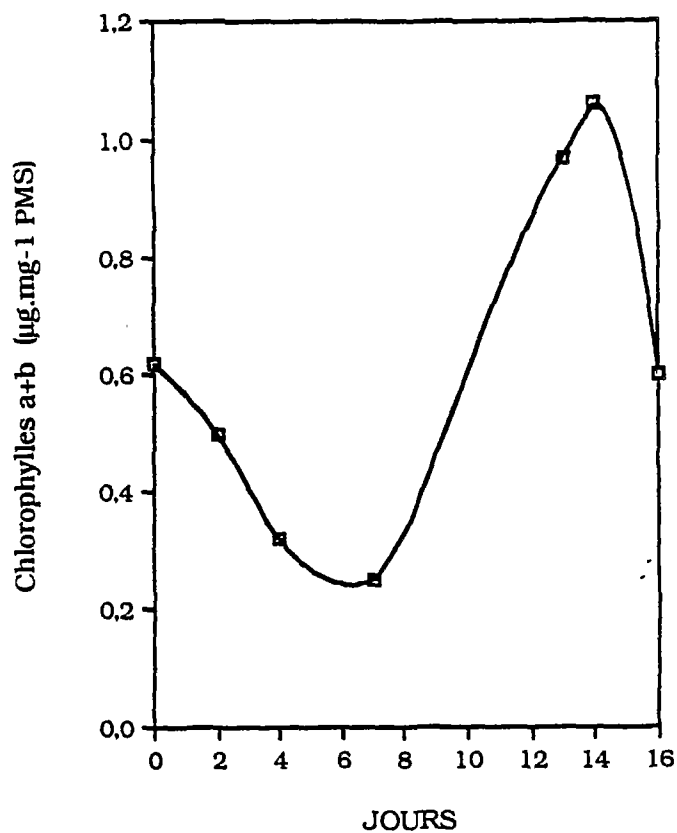
Les suspensions chlorophylliennes d'*Abrus* montrent donc un comportement hétérotrophe en début de culture, la croissance étant assurée par la "respiration" préférentielle du substrat carboné exogène : le saccharose.

En fiole, la fin du cycle de culture se traduit par une augmentation de l'activité respiratoire. Il semblerait dans ce cas qu'un métabolisme très oxydatif s'installe lors de la sénescence de la suspension.

De nombreux auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'intensité respiratoire concomitante à la consommation des sucres du milieu

EVOLUTION DES CHLOROPHYLLES TOTALES

Suspension photomixotrophe en fioles

**EVOLUTION DES CHLOROPHYLLES TOTALES**

Suspension photomixotrophe en bioréacteur

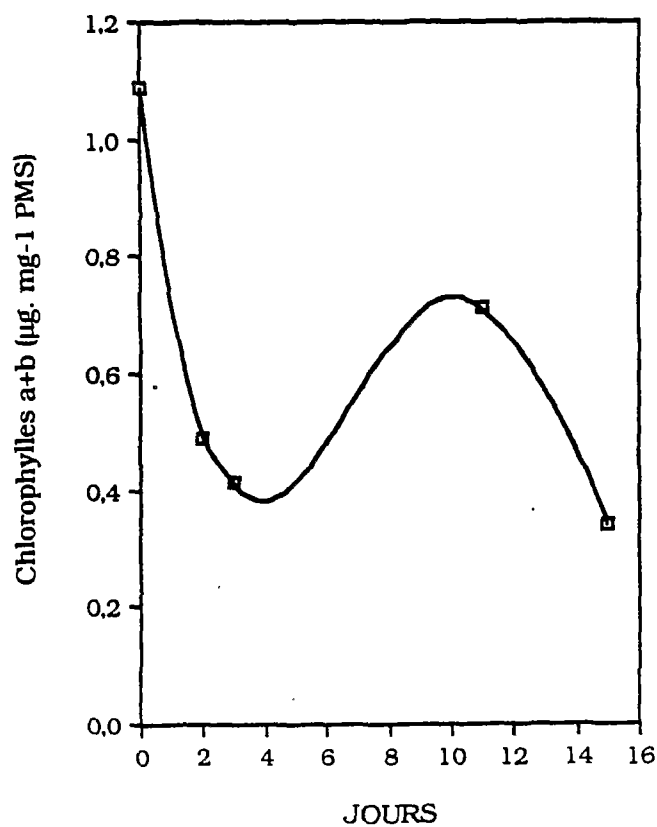


Figure n° 33 : Evolution des chlorophylles totales dans les cultures cellulaires photomixotrophes.

b) Evolution des échanges d'oxygène à la lumière :

Pour les cultures en erlens et en bioréacteur, l'activité photosynthétique ne s'exprime pas durant la phase exponentielle de croissance. On note, dans les deux cas, l'apparition d'une photosynthèse nette en fin de culture (à partir du 12^e jour). Cette photosynthèse nette est deux fois plus importante en fioles (100 $\mu\text{moles O}_2$ produites. $\text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ PMS) qu'en bioréacteur aéré.

Nous avons utilisé, lors de nos expérimentations en fioles d'Erlenmeyer, des bouchons en silicone hautes performances de type Versilic (fabrication Verneret). Ces bouchons, par leur caractéristiques physico-chimiques (perméabilité-diffusion) maintiennent dans les erlens une atmosphère confinée propice à l'expression de la photosynthèse : en effet, des mesures de la composition gazeuse dans les fioles, réalisées pour ce même matériel par HARDY (1984), ont montré que la teneur en CO_2 pouvait atteindre 10 fois celle de l'air ambiant, alors que la teneur en O_2 était plus faible (quelques %) par rapport à la normale. Ces résultats viennent confirmer les données présentées par DALTON & STREET (1976).

Cette photosynthèse est transitoire et ne représente qu'un état temporaire avant la sénescence de la culture ; la suspension est alors potentiellement autotrophe. Pour HARDY (1984), le gaz carbonique présent dans l'erlen (issu de l'activité respiratoire) est insuffisant pour assurer une croissance réellement photoautotrophe de la suspension.

I. HARDY-CLARIS (1988) a tenté, sur notre matériel végétal (lignée 6H photomixotrophe) de réaliser le passage à l'autotrophie, en atmosphère enrichie (2 %) en CO_2 . Une croissance autotrophe stable n'a malheureusement pas pu être obtenue.

L'auteur attribue cet échec au système de culture discontinu employé, qui semble insuffisant pour maintenir la pression de sélection nécessaire (pas de saccharose exogène, atmosphère enrichie en CO_2) à l'expression des capacités photosynthétiques d'un nombre suffisant de cellules. L'utilisation d'un système de culture différent (en continu par exemple) aurait sans doute permis de maintenir cette pression à un niveau permettant la sélection et la survie d'une population suffisante de cellules photoautotrophes.

3) Evolution de la teneur en chlorophylles : (suspensions photomixotrophes)

Les cellules cultivées en bioréacteur comme en fioles connaissent, durant les premiers jours de la culture, une inhibition de la synthèse des chlorophylles. La chlorophyllogénèse redevient active lors de la phase stationnaire, dès que la teneur en sucres du milieu est nulle (Figure n° 33). Cette évolution rappelle celle rencontrée dans les cals de prolifération de la même lignée.

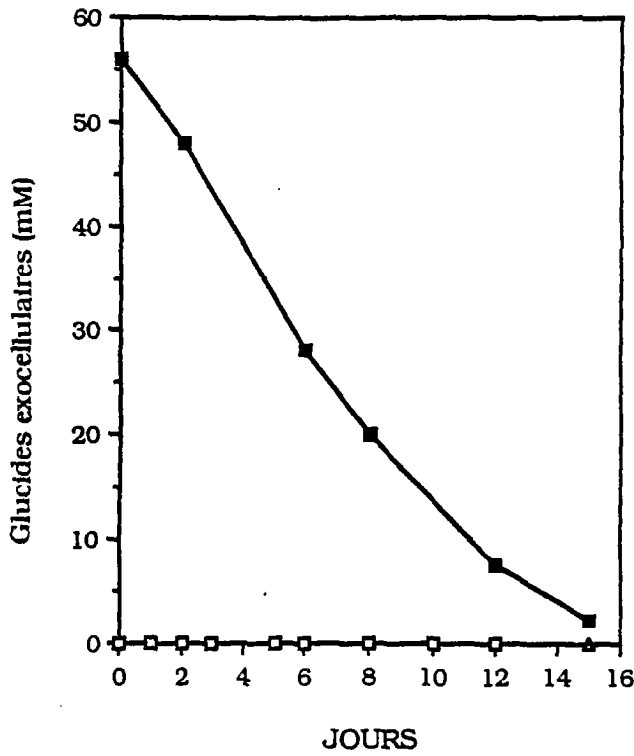
Exprimé par mg de PMS, le taux en pigments atteint 0,72 μg (au jour 11) pour les cellules en bioréacteur, et 1,1 μg (jour 14) pour les cellules en fioles. Les derniers jours avant repiquage voient diminuer sensiblement le taux en chlorophylles, indiquant une évolution de la culture vers un état senescent. Alors que le taux en chlorophylle est multiplié par 5,5 pour les cultures photomixotrophes en Erlenmeyer (atmosphère confinée), les cellules d'*Abrus* cultivées en réacteur agité et aéré synthétisent peu de chlorophylle ($\times 2$), ne rétablissant pas en fin de culture, dans nos conditions, la teneur initiale en pigments.

Lors du repiquage, les cellules sont mises en présence d'une teneur en sucre importante, qui limite la chlorophyllogénèse. Le saccharose constitue alors le substrat carboné privilégié, qui va être catabolisé par respiration.

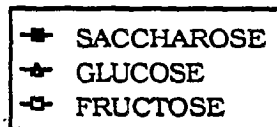
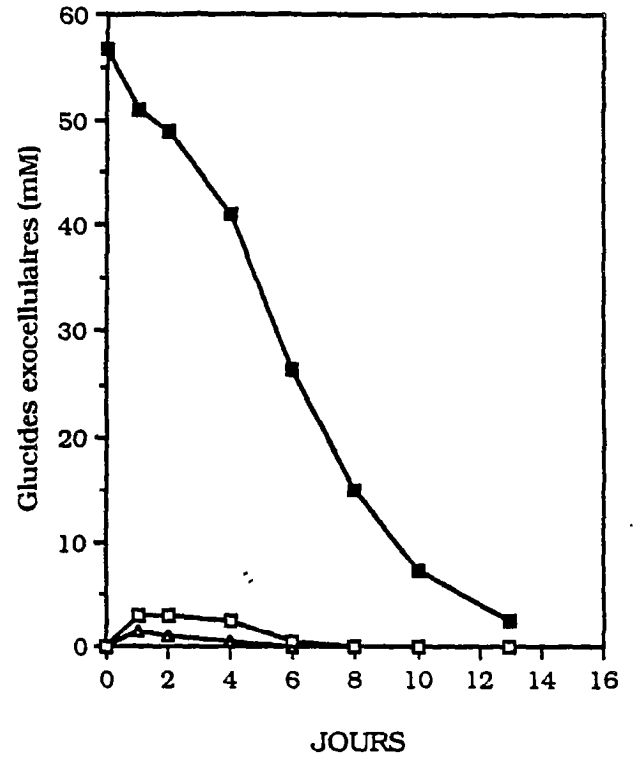
Ce rôle inhibiteur du saccharose sur la chlorophyllogénèse a été étudié par de nombreux auteurs (EDELMAN & HANSON - 1972 ; YAMADA & SATO - 1978 ; HARDY

EVOLUTION DES GLUCIDES EXOCELLULAIRES

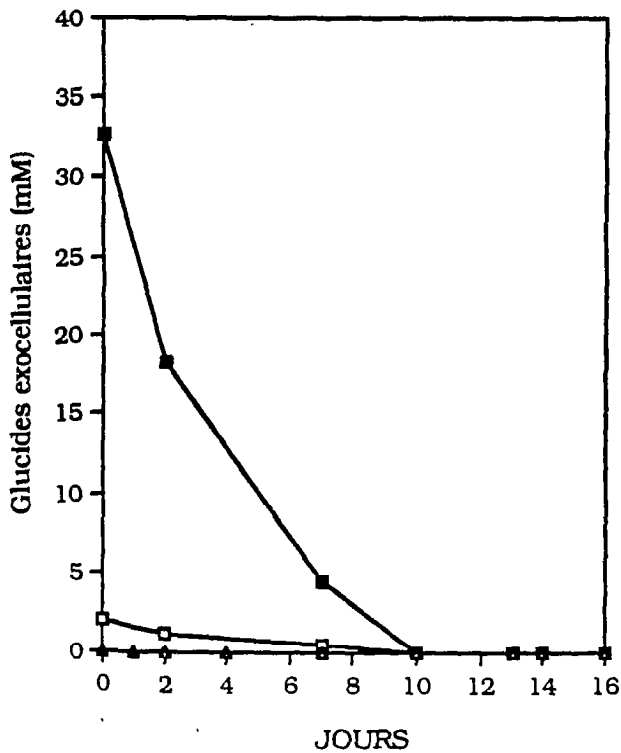
Suspension hétérotrophe en fiole

**EVOLUTION DES GLUCIDES EXOCELLULAIRES**

Suspension hétérotrophe en bioréacteur

**EVOLUTION DES GLUCIDES EXOCELLULAIRES**

Suspension photomixotrophe en fiole

**EVOLUTION DES GLUCIDES EXOCELLULAIRES**

Suspension photomixotrophe en bioréacteur

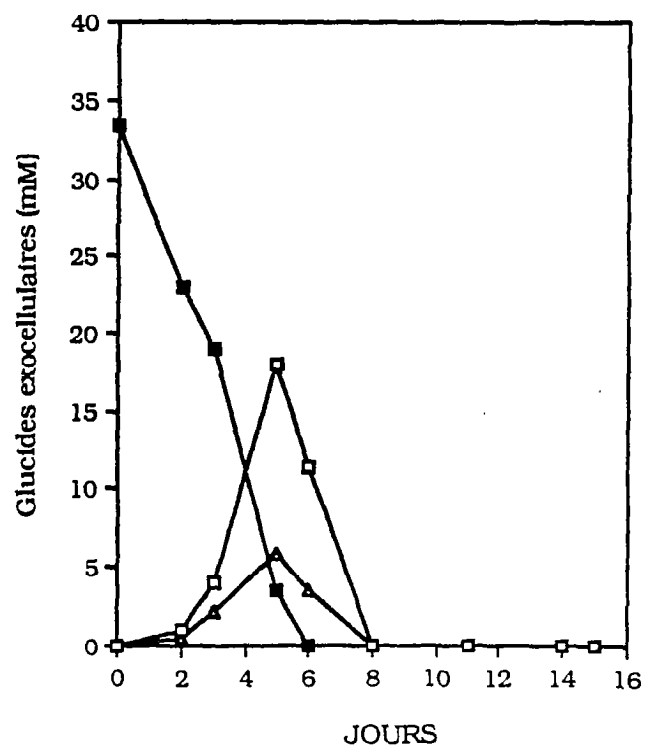


Figure n° 34 : Evolution des glucides exocellulaires dans les quatre types de cultures étudiés.

- 1984). Son effet se traduit alors par une réduction du nombre de chloroplastes par cellules et du développement des thylakoïdes (EDELMAN & HANSON - 1971). Cette inhibition du verdissement semble spécifique au saccharose ; elle n'est pas retrouvée si des sucres simples sont utilisés comme source de carbone (DURANTON *et al.* - 1964). En outre, elle n'est pas mise en évidence sur des lignées cellulaires présentant une haute activité invertasique (HEDELMAN & HANSON - 1972).

Pour NATO *et al.* (1977) la chute du taux en chlorophylles mesurée en début de croissance dans des suspensions cellulaires de *Nicotiana tabaccum* est liée à l'accumulation d'amidon dans les plastes.

Pour d'autres auteurs, elle est liée à la formation, dans les cellules en division rapide, de proplastides non fonctionnels (DAVEY *et al.* - 1971 ; SEYER *et al.* - 1975, ...).

En outre, de nombreux auteurs (HANSON & EDELMAN - 1972, DALTON & STREET - 1976, DALTON & PEEL - 1983) montrent que l'oxygène exerce un effet sur le développement des cellules photosynthétiques spécialisées, et notamment sur la synthèse des chlorophylles.

Par ailleurs, BERLYN & ZELITCH (1975) et HUSEMANN & BARZ (1977) montrent que la teneur en chlorophylle des cultures augmente sensiblement lorsque l'environnement gazeux des cellules est enrichi en CO₂.

Ces résultats, rapportés aux données obtenues par HARDY (19784) sur l'évolution de l'atmosphère dans les fioles de cultures, pourraient expliquer les modifications du taux en chlorophylles mesurées dans nos cellules, du moins pour les cultures en Erlen.

4) Nutrition carbonée :

a) Evolution des glucides exocellulaires : (Figure n° 34)

Dans toutes les cultures étudiées, la totalité, ou presque, du saccharose fourni dans le milieu est consommé par les cellules. Ce résultat est désormais classique, vérifié par de nombreux auteurs. (Revue bibliographique de STABA - 1980)

Le saccharose disparaît totalement du milieu de culture dans les suspensions photomixotrophes (après 10 jours en fioles, et 6 jours en bioréacteur). Dans ce type de culture, les sucres simples issus de l'hydrolyse du saccharose (glucose et fructose) apparaissent dans le milieu en quantité mesurable.

Pour les cellules cultivées en fioles, le fructose apparaît en très faible quantité (1,2 mM) après 48 heures de culture, et le glucose n'est pas détectable. Les cultures photomixotrophes en bioréacteur hydrolysent le saccharose en début de culture : vraisemblablement par l'action d'invertases pariétales (COPPING & STREET - 1972 ; EDELMAN & HANSON - 1972 ; THOM *et al.* - 1981). En effet, au 5^e jour, les sucres simples sont présents en quantité non négligeable (respectivement : 6 et 18 mM pour le glucose et le fructose) dans le milieu. Ici, le glucose est consommé préférentiellement au fructose, dont la concentration résiduelle reste toujours plus importante.

Cette évolution des glucides simples est apparemment fréquente, on la retrouve avec les cellules de Pomme (PAREILLEUX & CHAUBET - 1980), de Tabac (KATO & NAGAI - 1979), de *Catharanthus roseus* (MERILLON *et al.* - 1983).

Dans des conditions de photomixotrophie, la croissance ralentit au 8^e jour, lorsque le contenu en saccharose du milieu est totalement épuisé. Le saccharose pourrait alors être considéré comme l'un des facteurs limitants de la croissance .

Cependant, HARDY-CLARIS (1988), dans une étude portant sur l'effet de la concentration initiale en saccharose sur la cinétique de croissance, décrit, sur le même matériel, un effet limitant du saccharose mesurable seulement aux concentrations à

l'ensemencement inférieures à 22 mM. Au delà de ce seuil, comme c'est le cas ici (44 mM), un facteur limitant autre que le saccharose doit être pris en considération.

Chez les suspensions hétérotrophes, le saccharose du milieu n'est pas totalement consommé en fin de culture. Dans ce cas, la croissance s'arrête alors que le saccharose est encore présent en quantité non négligeable dans le milieu. On ne peut donc attribuer au saccharose un rôle de facteur limitant pour la croissance. Pour les cultures hétérotrophes en fioles, le glucose et le fructose ne sont présents qu'à l'état de traces, et seulement durant les premières 48 heures du cycle de culture. En bioréacteur, on détecte dans le milieu quelques mM seulement en sucres simples, avec un maximum au 2^e jour.

Le tableau suivant donne, pour les différents types de culture, le rendement de conversion en biomasse (PMS) du saccharose consommé :

	Suspension hétérotrophe en fioles	Suspension photomixotrophe en fioles	Suspension hétérotrophe en bioréacteur	Suspension photomixotrophe en bioréacteur
Rendement de conversion du saccharose (%)	44	60	47	36

Les rendements de conversion mesurés pour les suspensions hétérotrophes sont du même ordre que ceux décrits par MAUREL & PAREILLEUX (1986) pour des cellules hétérotrophes de *Catharanthus roseus* cultivées en Erlenmeyers (51%), et par PAREILLEUX & CHAUBET (1980) sur des suspensions cellulaires de pomme (57 %).

b) Evolution des glucides intracellulaires :

Isabelle HARDY-CLARIS (1988) a étudié, sur notre matériel végétal, l'évolution des sucres intracellulaires. Nous rappellerons ici brièvement ses résultats :

Sur les suspensions photomixotrophes en fioles, les sucres intracellulaires ne subissent pas une accumulation significative en cours de culture. Leur concentration, estimée sur la base d'un volume vacuolaire occupant 95% du volume total, reste constamment inférieure à 10 mM. Ces résultats concordent avec ceux avancés par MERILLON *et al* (1983) sur des suspensions hétérotrophes de *Catharanthus roseus*. Selon ces auteurs, une très faible teneur en saccharose est décelable dans les cellules, les sucres étant stockés par la cellule sous forme d'amidon. HARDY-CLARIS (1988) a pu montrer une nette augmentation du pool en amidon de cellules photomixotrophes d'*Abrus* au cours de la culture.

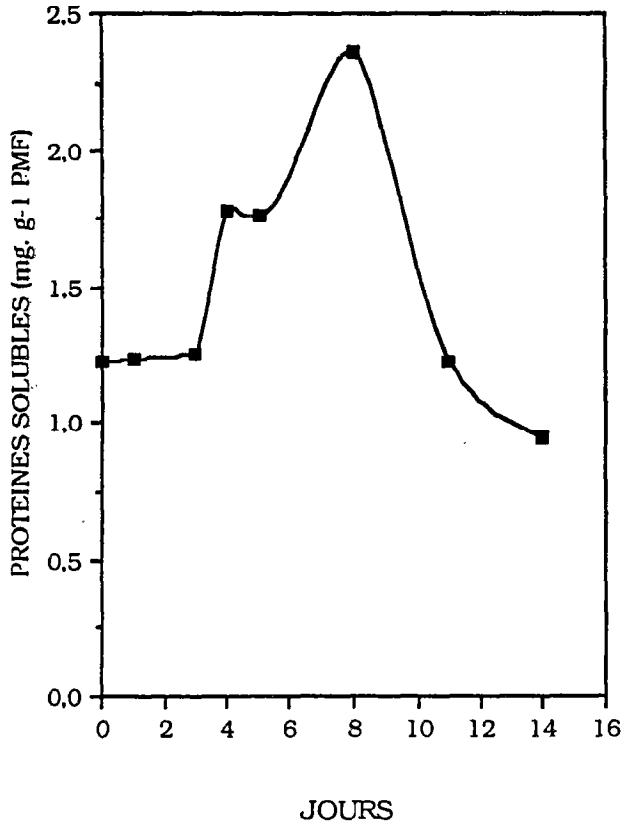
Cultivées en bioréacteur aéré, les cellules photomixotrophes accumulent transitoirement les sucres, (le saccharose, majoritairement). Les sucres totaux internes atteignent 70 mM au 2^e jour, puis diminuent régulièrement pour revenir à leur teneur initiale à l'ensemencement (10 mM environ).

En ce qui concerne les cellules hétérotrophes, HARDY-CLARIS (1988) note une concentration en glucides internes à l'inoculation très importante dans les cultures en fioles (67 mM environ). En cours de culture, l'auteur remarque une accumulation transitoire atteignant 20 mM (au troisième jour), puis la teneur initiale est progressivement restaurée. En bioréacteur, on note une évolution semblable, avec une forte teneur en sucres en début de culture (85 mM) et une accumulation transitoire portant sur 10 mM. En fin de culture, les teneurs en sucres intracellulaires augmentent, de manière concomitante à la diminution de l'intensité respiratoire.

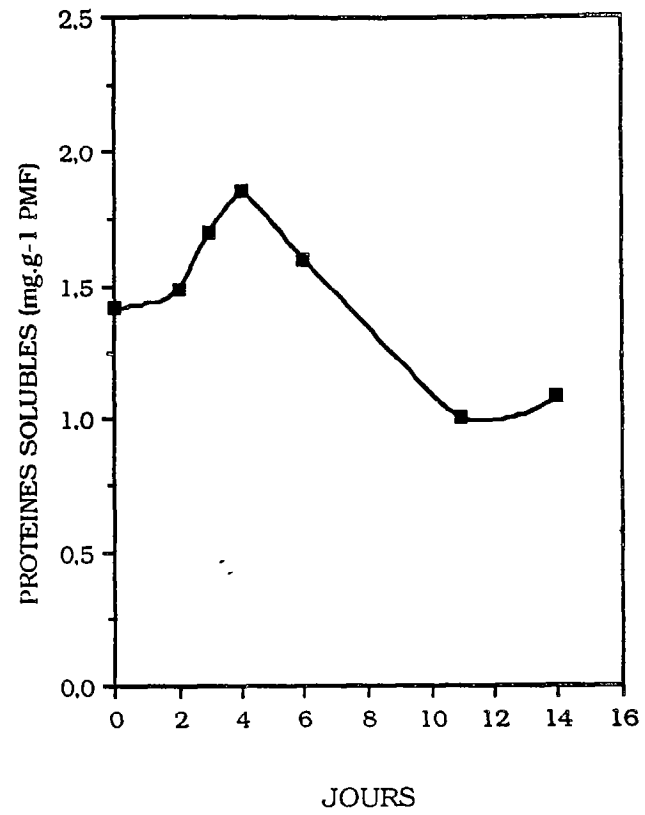
En conclusion, il ressort de cette étude que les sucres simples ne font pas l'objet d'une accumulation vacuolaire, mais d'un stockage transitoire précédant leur incorporation.

EVOLUTION DES PROTEINES SOLUBLES

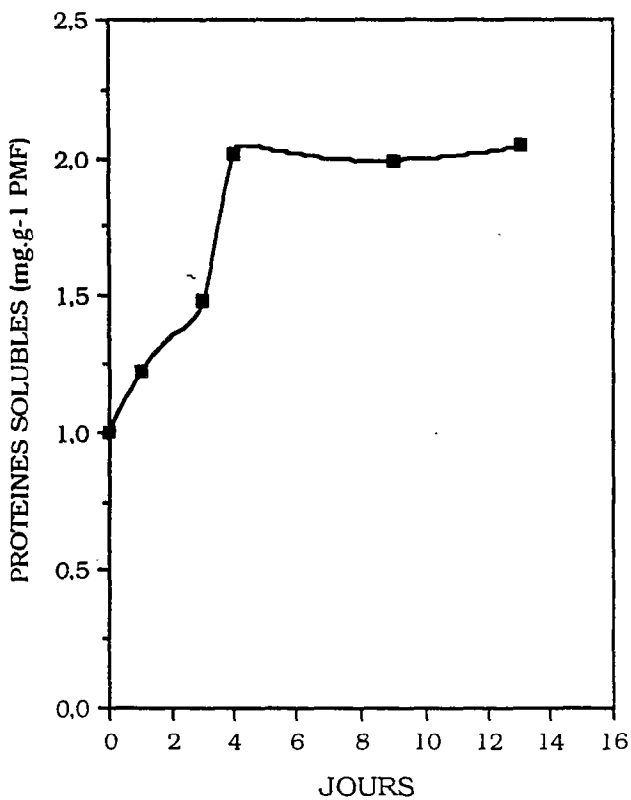
Suspension hétérotrophe en fioles

**EVOLUTION DES PROTEINES SOLUBLES**

Suspension photomixotrophe en fioles

**EVOLUTION DES PROTEINES SOLUBLES**

Suspension hétérotrophe en bioréacteur

**EVOLUTION DES PROTEINES SOLUBLES**

Suspension photomixotrophe en bioréacteur

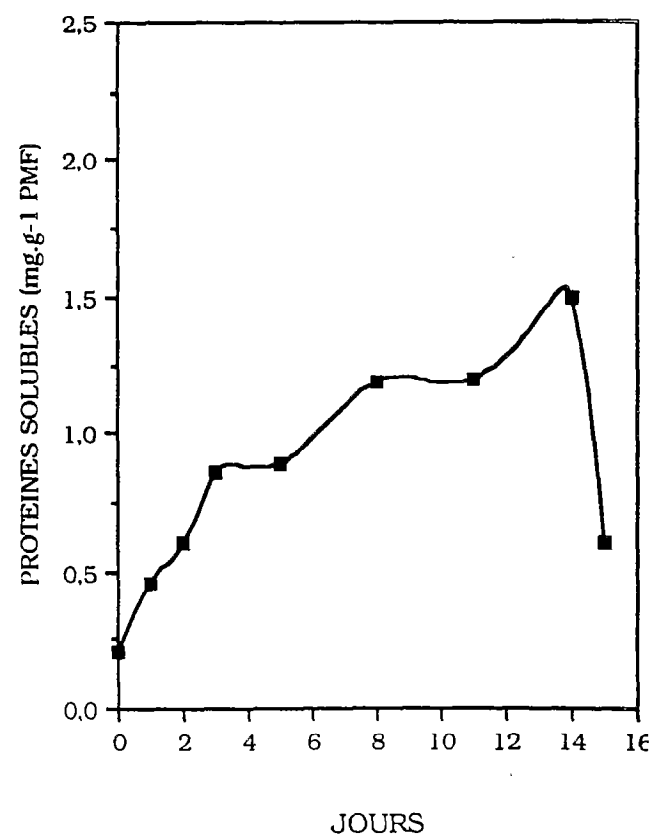


Figure n° 35 : Evolution des protéines solubles intracellulaires dans les quatre types de cultures étudiés.

5) Evolution des protéines solubles : (Figure n° 35)

Le pool total en protéines solubles suit, pour tous les types de culture, une augmentation nette au cours de la culture. Ce phénomène de protéosynthèse précoce, dans les quelques heures suivant le repiquage, a été remarqué par de nombreux auteurs : GIVAN & COLLIN (1967) sur des cultures cellulaires hétérotrophes d'*Acer pseudoplatanus* ; BAYLEY *et al.* (1972) sur des cellules de soja et de blé, NATO (1984) sur des suspensions cellulaires de tabac.

Chez *Abrus precatorius*, le taux en protéines solubles est multiplié par 7 dans le cas des cultures photomixotrophes en bioréacteur.

Les valeurs maximales atteintes, exprimées par rapport au PMF, sont toujours supérieures pour les cellules hétérotrophes, en réacteur comme en fiole.

Suivant les types de culture la courbe d'évolution est sensiblement différente :

- * dans les cultures en bioréacteur, hétéro- ou photomixotrophes, l'augmentation du pool protéique est mesurable dès les premiers jours de culture. Cette tendance se poursuit jusqu'au 14^e jour pour les cultures mixotrophes, alors que le pool protéique se stabilise dès le 4^e jour dans les cellules hétérotrophes. A partir du 14^e jour, ce taux semble décroître dans les cellules mixotrophes (cette évolution doit être considérée avec prudence, car elle est basée sur la mesure d'un seul prélèvement).

NASH & DAVIES (1972) décrivent une augmentation concomitante des ARN et des protéines solubles durant la phase exponentielle, suivie d'une phase où ces deux paramètres restent stables, à des valeurs proches du maximum précédemment atteint.

- * Les cultures en fioles présentent un maximum net dans la teneur en protéines : au 4^e jour pour les cellules mixotrophes, au 8^e jour pour les cellules hétérotrophes. Ce pic atteint 2 fois la valeur du taux initial dans la culture hétérotrophe. Il est moins marqué chez les cellules mixotrophes (30 % d'augmentation). THOM *et al* (1981) décrivent une évolution des protéines solubles semblable (augmentation importante et transitoire), chez une suspension cellulaire hétérotrophe de canne à sucre cultivée en batch.

Grâce à des immunosélections suivies d'électrophorèses de type SDS-PAGE, nous avons pu mettre en évidence, sur notre lignée 6H d'*Abrus precatorius* photomixotrophe, une néosynthèse nette, dans les quinze premières heures de la culture, d'enzymes telles que : Rubisco, PEPcase et Nitrate Réductase (Voir le Chapitre D).

6) Evolution du pH du milieu : (Figure n° 36)

Dans les quatre types de cultures, le pH du milieu suit une évolution semblable : ce dernier subit une acidification très nette dès les premiers jours de culture, puis s'alcalinise progressivement. Chez les suspensions photomixotrophes en bioréacteur, l'acidification semble plus transitoire, le milieu atteignant dès le 3^e jour un pH stable. Cette acidification rapide porte sur environ une unité de pH. On retrouve en fin de culture un pH du milieu voisin du pH initial (5,8 environ).

Les milieux de cultures les plus couramment employés ont un pouvoir tampon très faible. En effet, dans la gamme de pH comprise entre 5 et 6, le seul élément du milieu capable d'assurer cette fonction est le phosphate. Dans la plupart des cas, les concentrations utilisés (1 à 5 mM) sont évidemment insuffisantes pour tamponner efficacement la solution minérale.

Pour de nombreux auteurs, l'acidification du milieu en début de culture peut être attribuée à une excrétion de protons ou d'acides organiques destinée à rétablir un équilibre électrique entre la cellule et le milieu extérieur, par suite de l'absorption massive d'ions NH_4^+ (Les ions ammonium sont présents à la concentration de 20 mM à

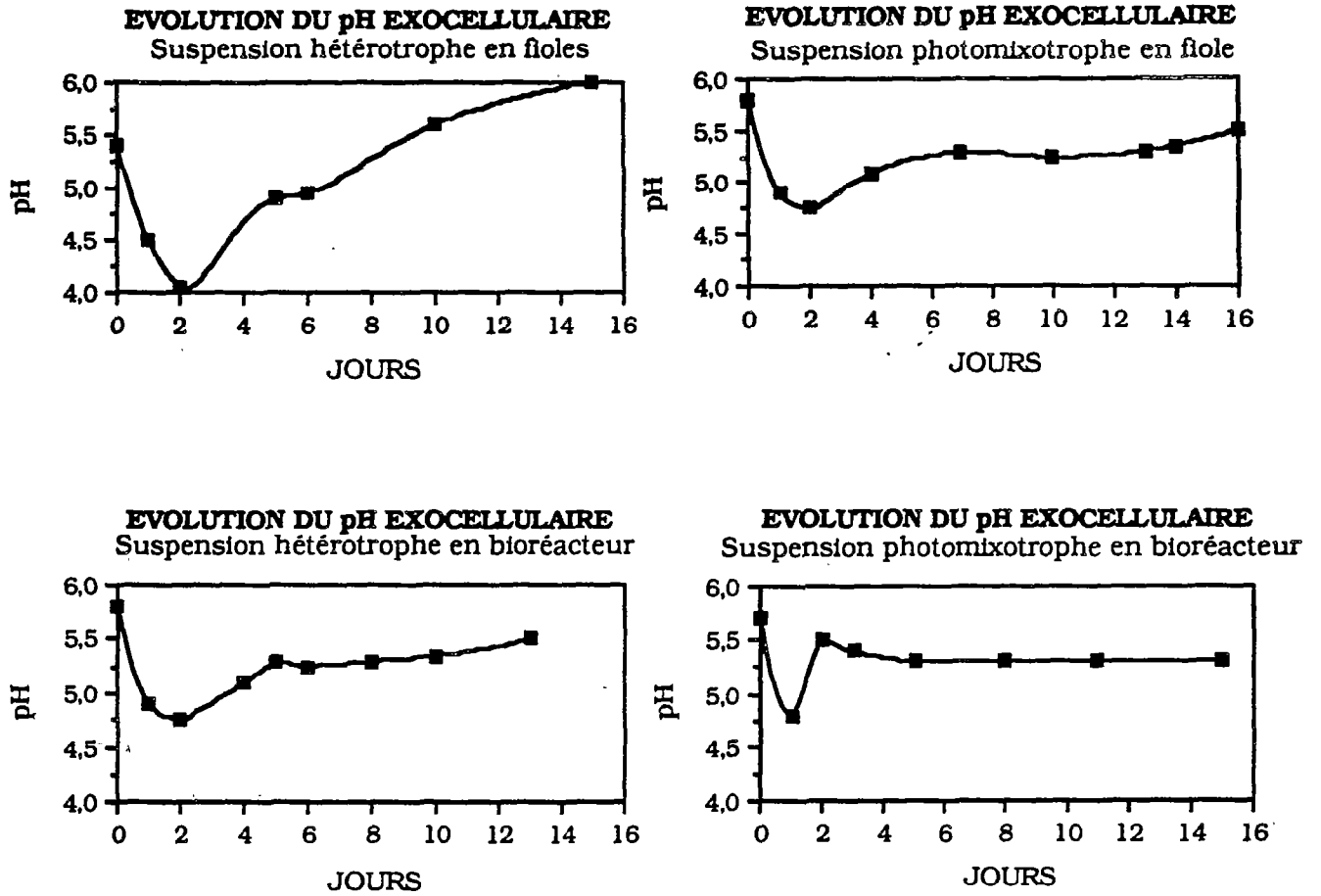


Figure n° 36 : Evolution comparée du pH exocellulaire

l'ensemencement dans un milieu MS): MATSUMOTO *et al.* (1971); Revues bibliographiques de DOUGALL (1980) et de MARTIN (1980 b).

Divers travaux attribuent ces variations du pH exocellulaire au cours de la culture à la consommation séquentielle des éléments azotés du milieu (ROSE & MARTIN - 1975 ; BRASSART *et al.* - 1978 ; KATOH *et al.* - 1980 ; MARTIN - 1980 b). La chute de pH en début de culture et l'alcalinisation du milieu correspondent alors aux périodes respectives d'utilisation des ions ammonium et nitrate.

La composition minérale du milieu intervient ainsi dans l'évolution du pH. DUBOIS (1980) montre clairement sur des cellules de *Silene alba* une alcalinisation du milieu dans des cultures en nutrition nitrrique.

Ainsi, VELIKY & ROSE (1973) montrent que les milieux riches en nitrates (de type M. & S.) évoluent vers la neutralité au cours de la culture ; par contre les milieux pauvres en NO_3 s'acidifient progressivement pour atteindre un pH de 3,8 en fin de cycle.

La production importante de CO_2 (dissous sous forme d'acide carbonique) au cours du pic respiratoire en début de culture pourrait également causer une acidification du milieu (NEF - 1983).

Le système de "pH-Stat" bioosmotique, tel qu'il a été défini par RAVEN & SMITH (1976) fonctionne dans les cultures cellulaires au même titre que dans les racines.

Nota : La notion de pH-Stat est employée ici de manière abusive, car elle ne correspond en rien à la définition exposée par DAVIES (1973), qui concerne la faculté de la cellule végétale à réguler son pH interne. Ce qui est noté dans le cas présent, est l'action des cellules sur leur milieu extérieur.

La cellule est capable de compenser, par des flux trans-plasmalemmiques, les modifications des équilibres ioniques entre les milieux intra- et extracellulaires causés par la consommation des éléments minéraux (GAUTHERET - 1959; DOUGALL - 1980 ; BRASSART *et al.* - 1984 ; CHAUMONT & GUDIN - 1985 a).

Ainsi, ERIKSSON (1965) montre qu'une suspension cellulaire d'*Haplopappus gracilis* cultivée sur des milieux de pH initial (pH_i) 4,2 à 6,9 ramène le pH à 5,5 +/- 0,2 en fin de culture (12 jours).

De même, BUTENKO *et al.* (1984) décrivent, pour des cultures cellulaires de *Dioscorea deltoidea* un ajustement du pH à 4,5 après 50 heures de culture sur des milieux de pH_i allant de 3,5 à 6,5.

Afin d'étudier l'impact de ce ΔpH en cours de culture sur le métabolisme cellulaire, plusieurs auteurs ont établi des cultures sous un pH contrôlé.

MARTIN & ROSE (1975) ont conduit des cultures d'*Ipomea* sous un pH stabilisé à diverses valeurs (pH = 4,8 à 7,1). La croissance a été possible à tous les pH, avec un rendement en biomasse inférieur pour les valeurs extrêmes, et les résultats obtenus montrent que le pH peut affecter le développement de la culture *via* l'utilisation des composés azotés. La capacité des cellules à consommer l'ammonium croît avec la valeur du pH, alors que leur affinité pour le nitrate décroît, pour atteindre 0 à pH = 7,1.

MARTIN *et al.* (1977) montrent que, dans des conditions de pH externe stabilisé, les cellules d'*Ipomea* et de soja peuvent croître sur un milieu renfermant de l'ammonium comme seule source d'azote.

Les systèmes enzymatiques assurant les étapes primitives de l'incorporation des nutriments azotés sont donc impliquées dans la fonction "pH-Stat externe" des cellules végétales (BRASSART *et al.* - 1978)

7) Discussion : caractéristiques du métabolisme primaire :

En ce qui concerne les paramètres de la croissance et du métabolisme primaire, nous pouvons mettre en évidence des différences importantes dans le comportement des cellules, en fonction de leur nature hétérotrophe ou photomixotrophe, et de la technique de culture employée (voir le Tableau n° 8).

a) comparaison entre cultures hétéro - & photomixotrophes:

En fioles d'Erlenmeyer, les suspensions hétérotrophes présentent un métabolisme primaire moins actif, caractérisable par un temps de doublement plus long, une intensité respiratoire plus faible, et un rendement de conversion du saccharose plus bas, par rapport aux suspensions photomixotrophes.

En bioréacteur, ces différences sont beaucoup moins nettes, excepté pour l'intensité respiratoire, qui reste plus importante pour les cellules photomixotrophes. Il semble, au vu de ces premières analyses, que le transfert en bioréacteur induit un traumatisme suffisant dans les lignées pour estomper les différences très nettes mises en évidence dans les cultures en fioles.

b) comparaison entre cultures en fioles et en réacteur :

Le passage en bioréacteur agité et aéré modifie peu la croissance des cellules hétérotrophes, mais induit une baisse du taux de croissance et de la productivité en biomasse dans les suspensions photomixotrophes.

Chez les suspensions mixotrophes, le passage en réacteur se traduit également par une baisse de la teneur en chlorophylles, du rendement de conversion du saccharose en biomasse, et de l'intensité photosynthétique maximale.

Par contre, la suspension hétérotrophe semble relativement indifférente aux modifications apportées dans son environnement lors du transfert en bioréacteur.

Au vu de ces premiers résultats, la lignée cellulaire photomixotrophe apparaît donc comme un système plus fragile, sur lequel le transfert fiole/réacteur induit une pression importante.

Les tendances mises en évidence dans cette première étude demandent à être confirmées par l'étude d'autres marqueurs de l'activité du métabolisme primaire: la nutrition minérale et les activités enzymatiques qui s'y rapportent.

	SUSPENSION HETEROTROPHE EN FIOLES	SUSPENSION PHOTOMIXOTROPHE EN FIOLES	SUSPENSION HETEROTROPHE EN BIOREACTEUR	SUSPENSION PHOTOMIXOTROPHE EN BIOREACTEUR
Taux de croissance (μ)	0,14	0,24	0,16	0,14
Temps de doublement (jour)	5	3	4,5	5
Productivité en biomasse (g. PMS . jour-1 . litre-1)	0,95	0,55	0,7	0,53
Intensité respiratoire maximale à l'obscurité (μ moles O ₂ .h-1.g-1 PMS)	138	290	120	380
Intensité photosynthétique maximale (μ moles O ₂ .h-1.g-1 PMS)	-	90	-	40
Chlorophylles totales (μ g.g-1 PMS)	-	1,1	-	0,7
Rendement de conversion du saccharose (%)	44	60	47	36
Protéines solubles (mg. g-1 PMF)	2,35	1,75	2	1,5
Vitesse de consommation du nitrate (μ moles . jour -1 . g-1 PMF)	5,4	7,5	25,7	23,8
Vitesse de consommation de l'ammonium (μ moles . jour -1 . g-1 PMF)	4,4	6,6	12,9	30,7
Vitesse de consommation des sulfates (μ moles . jour -1 . g-1 PMF)	1,2	1	1,5	3,4
Activité Nitrate Réductase maximale (μ moles NO ₂ . h-1 . mg-1 prot.)	0,48	0,78	0,62	2
Activité Glutamine Synthétase maximale (μ moles GH. h-1 . mg-1 prot.)	1,15	4,2	-	-
Activité Rubisco maximale (μ moles CO ₂ . h-1 . mg-1 prot.)	2,25	0,35	N.D.	2,5
Activité PEP Case maximale (μ moles CO ₂ . h-1 . mg-1 prot.)	20	7,5	14	4

Tableau n° 12 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU METABOLISME PRIMAIRE

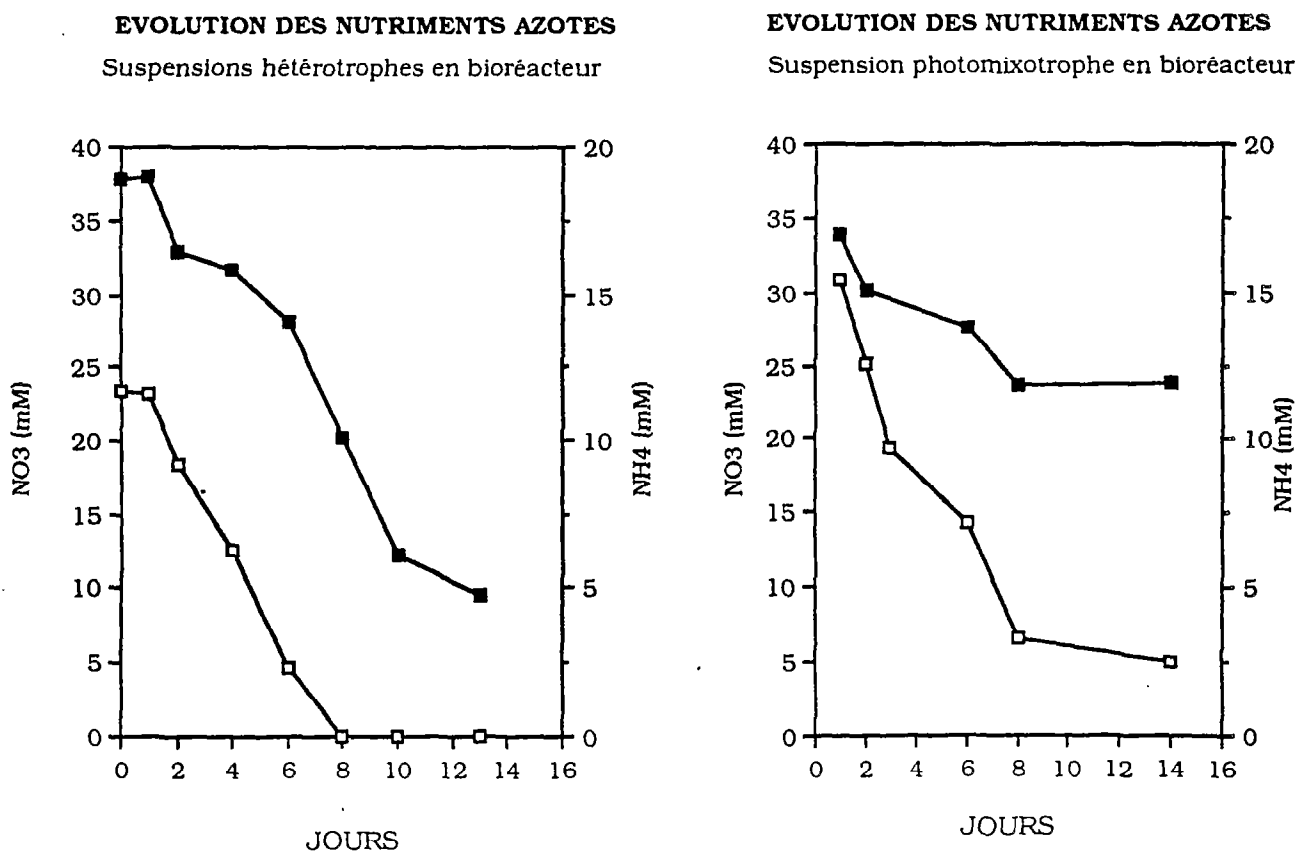
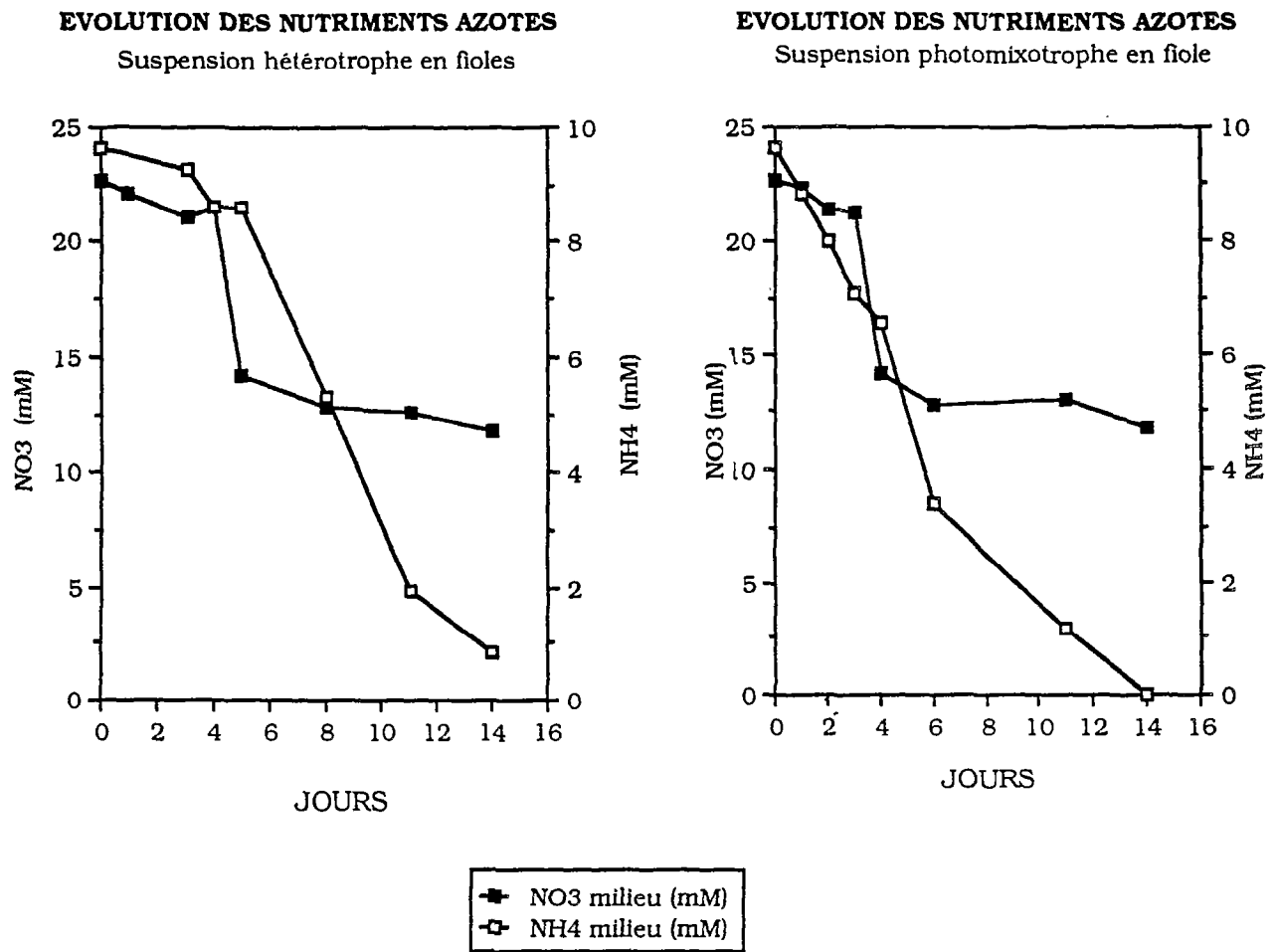


Figure n° 37 : Evolution comparée des nutriments azotés

C) CINÉTIQUE DE LA NUTRITION MINÉRALE DANS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES MIXO - & HÉTÉROTROPHES CULTIVÉES EN ERLÉNMEYER ET EN BIOREACTEUR AÉRIÉ :

Nota : Nous emploierons, dans la suite de notre travail, le terme de consommation en ions de préférence à ceux d'assimilation, d'incorporation, ou d'absorption. Il est bien évident que la seule mesure de la disparition d'éléments dans le milieu ne peut rendre compte de la signification réelle, pour la cellule, de cette disparition.

L'étude de la vitesse de prélèvement dans le milieu de culture des différents ions minéraux va nous permettre de visualiser simultanément l'impact sur la nutrition minérale de deux paramètres différents :

- l'emploi de deux systèmes de culture différents , et
- le comportement vis à vis de la nutrition carbonée des cultures (hétérotrophie / photomixotrophie).

Les mesures de concentrations intracellulaires en composés minéraux ont été réalisées sur une culture photomixotrophe en fiole différente de celle décrite jusqu'ici. Nous avons donc rappelé la courbe d'évolution de la biomasse pour cette culture.

Le nombre important de paramètres biochimiques analysés sur les autres cultures, et la faible quantité d'extrait cellulaire disponible à chaque prélèvement ne nous ont malheureusement pas permis de généraliser les dosages de minéraux internes.

1) Cinétique de consommation des ions nitrate (NO_3^-) :

a) Résultats : (Figure n° 37)

Dans les suspensions hétéro- et photomixotrophes cultivées en fioles d'Erlenmeyer, les nitrates sont très faiblement consommés durant les quatre premiers jours. La consommation en NO_3^- devient très nette entre le 4^e et le 8^e jour, pour ensuite n'évoluer que très faiblement jusqu'à la fin de la culture. La moitié seulement du pool en nitrates offert par le milieu est consommé.

Les deux types de cultures en bioréacteur présentent un profil différent : la consommation en nitrates est active dès le premier jour de culture. Les cellules mixotrophes ne consomment plus de nitrates à partir du 8^e jour ; dans ce cas, un tiers seulement des nitrates disponibles est consommé.

Par contre, les suspensions hétérotrophes montrent une courbe de consommation en nitrates linéaire tout au long de la culture : 23 % des nitrates fournis à l'ensemencement sont encore présents dans le milieu en fin de culture.

Dans tous les cas, on peut noter une limitation de la croissance de la suspension alors que les nitrates sont encore présents en quantité importante dans le milieu. De plus, le rapport des nitrates exocellulaires/nitrates endocellulaire est presque toujours voisin de 3. Le gradient de nitrates est toujours en faveur du milieu, ce qui devrait favoriser son entrée dans la cellule.

La présence de nitrates résiduels dans le milieu était prévisible : en effet, nous avons employé un milieu adapté à une croissance rapide des cellules végétales : le milieu de MURASHIGE & SKOOG (1962) . Ce milieu est, parmi les plus couramment utilisés, le plus riche en nutriments azotés, notamment en nitrates (voir le tableau n° 5).

Il conviendra donc d'optimiser le milieu M.&S. en réduisant notablement l'azote nitrique. De telles améliorations ont été suggérées par de très nombreux auteurs,

conduisant ces derniers à modifier la composition de la solution d'origine en réduisant le taux en azote minéral (voir le chapitre : Données bibliographiques; § C).

BAYLEY *et al.* (1972) sur un milieu pourtant moins riche en nitrates (GAMBORG B₅), remarquent la présence de nitrates résiduels en fin de culture, chez des suspensions cellulaires de blé et de soja.

Pour une suspension cellulaire d'*Anchusa officinalis*, De-EKNAMKUL & ELLIS (1985) montrent que le milieu de GAMBORG B₅ est supraoptimal, à la fois pour la croissance et la production d'acide rosmarinique. Ces auteurs déterminent une teneur en nitrates optimale à 15 mM, au lieu des 25 mM fournis par le milieu de GAMBORG.

b) Evolution des concentrations intracellulaires : (Figure n° 38)

Un suivi de la teneur en nitrates intracellulaires permet de mettre en évidence une accumulation transitoire de cet ion lors de la phase exponentielle de croissance. L'accumulation est très rapide, le taux maximal est obtenu dès le 2^e jour. La teneur en nitrates internes s'annule au jour 5, alors que le milieu renferme encore une quantité non négligeable de NO₃⁻ (12 mM).

MARIGO *et al.* (1986) décrivent les modifications intracellulaires induites lors de l'accumulation des ions nitrate suivant le transfert de cellules de *Catharanthus roseus* sur un milieu neuf. Ces auteurs montrent que l'accumulation vacuolaire des nitrates s'accompagne, dans les premières 48 heures de culture, d'une chute des teneurs en acide malique. Ces variations sont caractérisées par des modifications typiques du pH vacuolaire (alcalinisation). A partir du 3^e jour de culture, les tendances s'inversent à l'intérieur de la cellule (diminution des concentrations en nitrates, et augmentation des concentrations en malate). Pour des auteurs, le déplacement des ions nitrate et malate pourraient s'effectuer de façon couplée et opposée. La sortie du nitrate de la vacuole vers le compartiment cytosolique, où a lieu sa réduction par la NR, nécessite donc une entrée de malate contre un gradient de concentration. Ce transport actif intervenant dans la création du gradient de protons nécessite de l'énergie (ATP).

Ce résultat est cohérent avec les événements qui ont lieu dans la cellule lors des premiers jours de culture : hydrolyse du saccharose et augmentation de la concentration en ATP dans la cellule (HARDY-CLARIS - 1988).

ROSE & MARTIN (1974) définissent une première phase de croissance, appelée "phase d'accroissement du cytoplasme", suivie d'une phase dite "de maturation", caractérisées par respectivement, une accumulation, puis une consommation des réserves intracellulaires en azote.

Si l'on considère que la totalité du nitrate interne est vacuolaire (MARIGO *et al.* 1986), et si l'on estime le volume vacuolaire à 90 % du volume cellulaire total, on s'aperçoit que la cellule n'accumule pas le nitrate, mais le stocke transitoirement (la concentration cellulaire maximale représente la moitié environ de la concentration externe disponible).

c) Comparaison et discussion :

On note un arrêt de la consommation en nitrates, alors que le taux en NO₃ interne est très faible ou nul.

Tout se passe comme si les mécanismes d'absorption des nitrates étaient bloqués par un facteur autre que la non disponibilité en cet élément. En effet, si l'on observe l'évolution du rapport NO₃ extracellulaire/NO₃ endocellulaire, on s'aperçoit que ce rapport est constamment supérieur à 1 durant toute la culture (Figure n° 39). Les nitrates ne font donc pas l'objet d'une accumulation dans la cellule, mais d'un stockage

transitoire. Ce rapport devient très élevé en fin de culture, signe d'un arrêt de l'absorption alors que les nitrates internes sont en très faible concentration.

MERILLON *et al.* (1983) mettent en évidence, dans des cellules de *Catharanthus roseus*, une évolution des nitrates internes semblable: le taux en NO_3 endocellulaire est très faible en fin de culture, alors que les nitrates sont encore disponibles en grande quantité dans le milieu extérieur.

VELIKY & ROSE (1973) optimisent le rapport $\text{NH}_4 / \text{NO}_3$ (1/4) du milieu de cultures de cellules de *Daucus carota* pour la production de biomasse. Pour ces auteurs, les changements de pH observés au cours de la croissance dans les différents milieux testés pourraient influencer le métabolisme azoté des cellules. Le pouvoir tampon du milieu joue ici un rôle considérable. Nous avons précédemment mis en évidence le rôle important accordé aux ions nitrates dans la régulation du pH-Stat biosmotique des cellules.

D'autre part, les problèmes de transport du nitrate et de sa disponibilité à la réduction dans la cellule seront discutés lors de l'étude de l'activité Nitrate Réductase dans nos cultures.

2) Cinétique de consommation des ions ammonium :

a) Résultats : (Figure n° 37)

Dans les quatre types de cultures étudiés, la quasi-totalité des réserves en ammonium du milieu est épuisée à la fin de la culture. Les suspensions hétérotrophes en bioréacteur consomment la totalité du NH_4 + disponible en 8 jours.

b) Evolution des concentrations intracellulaires : (Figure n° 38)

L'ammonium intracellulaire montre un maximum au 4^e jour de culture. La teneur en NH_4 est alors de 37 μmoles par gramme de Matière Fraîche (équivalent à environ 35 mM). Cette phase d'accumulation, de courte durée, est suivie d'une phase de consommation régulière. En fin de culture, le taux intracellulaire en ammonium n'est plus que de 13 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ PMF (12 mM). Si l'on estime le volume vacuolaire à 90 % environ du volume cellulaire total, on remarque que la cellule est capable d'accumuler transitoirement l'ammonium jusqu'à 2 fois sa concentration dans le milieu externe.

LAMBERT (1989) sur des suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii* montre des différences dans la cinétique de prélèvement des ammonium dans le milieu, en fonction du comportement photosynthétique de la lignée considérée. Ainsi, l'auteur note une teneur en NH_4 interne variant de 5 à 15 mM (jour 4) dans les cellules photomixotrophes, et de 12 à 20 mM (jour 2) dans les cellules hétérotrophes.

Si l'on considère l'évolution du rapport NH_4 extracellulaire / NH_4 intracellulaire (Figure n° 39), on remarque que ce rapport devient inférieur à 1 dès le 3^e jour de culture.

L'ammonium fait donc l'objet d'une accumulation précoce dans la cellule, et il demeure en concentration plus importante dans la cellule que dans le milieu.

Ces résultats sont en contradiction avec les données publiées par MERILLON *et al.* (1983), montrant des taux en ammonium intracellulaire extrêmement faibles, avec une légère accumulation à la 8^e heure de culture. La concentration intracellulaire représente alors seulement 1/10^e de la teneur totale dans le milieu à l'ensemencement.

De même, BRADFORD & FLETCHER (1982) dosent de très faibles quantités en ammonium intracellulaire (0,77 mM maximum en début de phase exponentielle) dans des

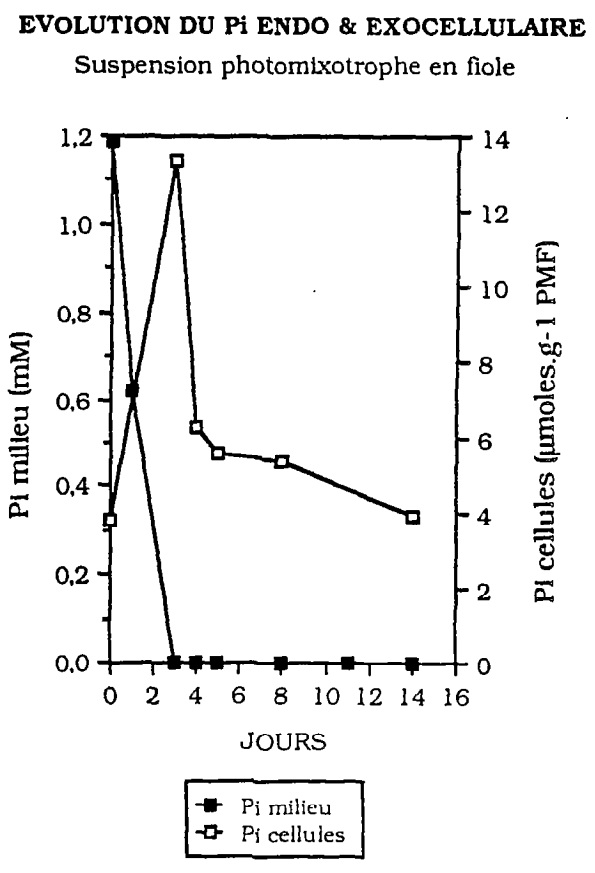
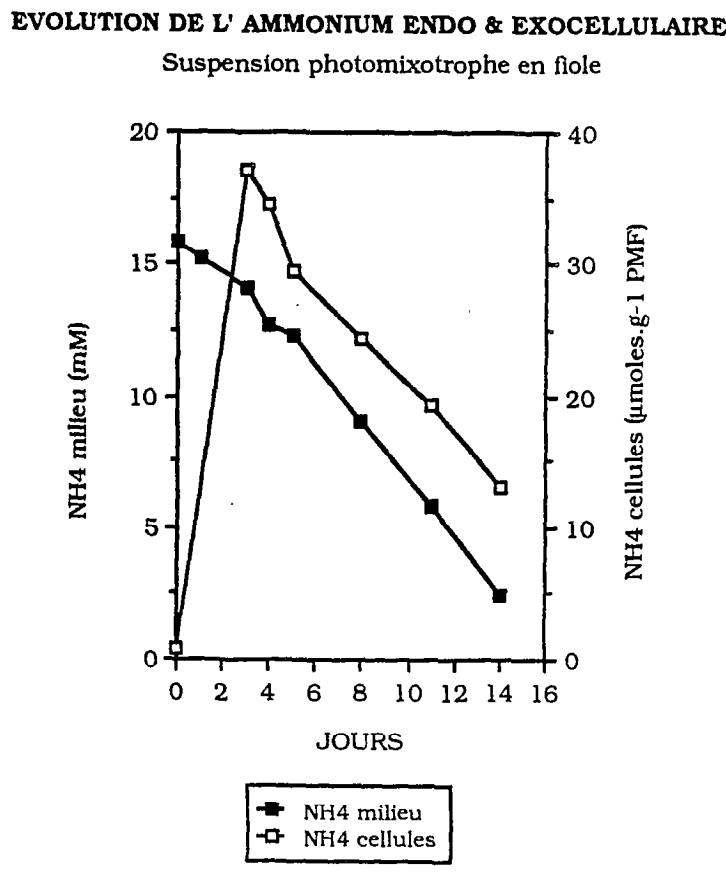
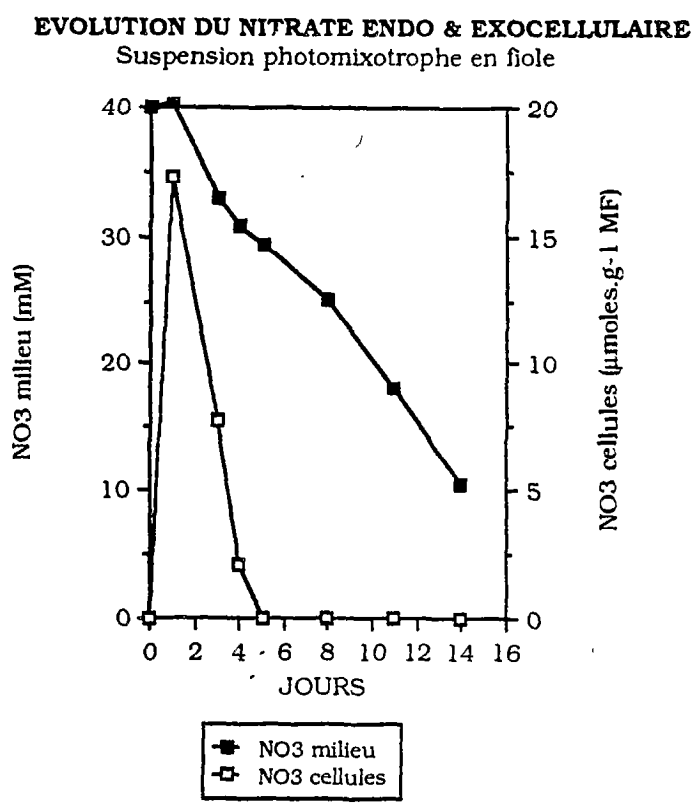
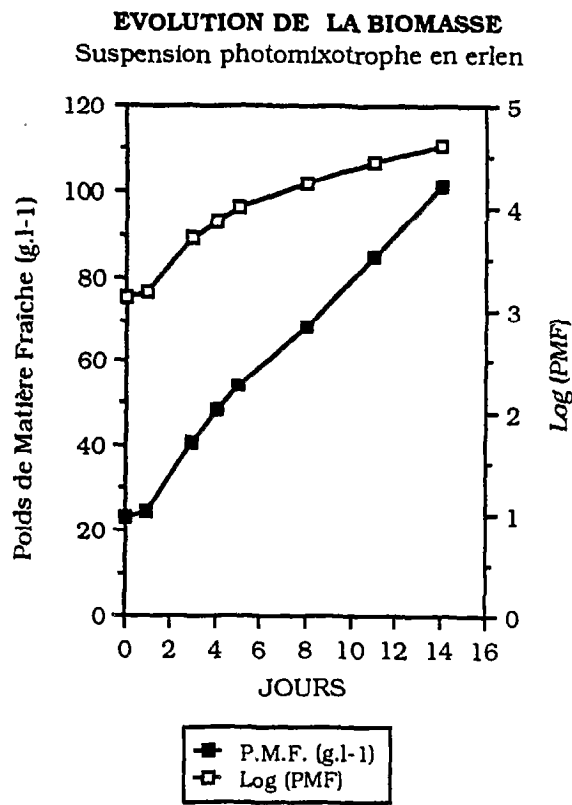
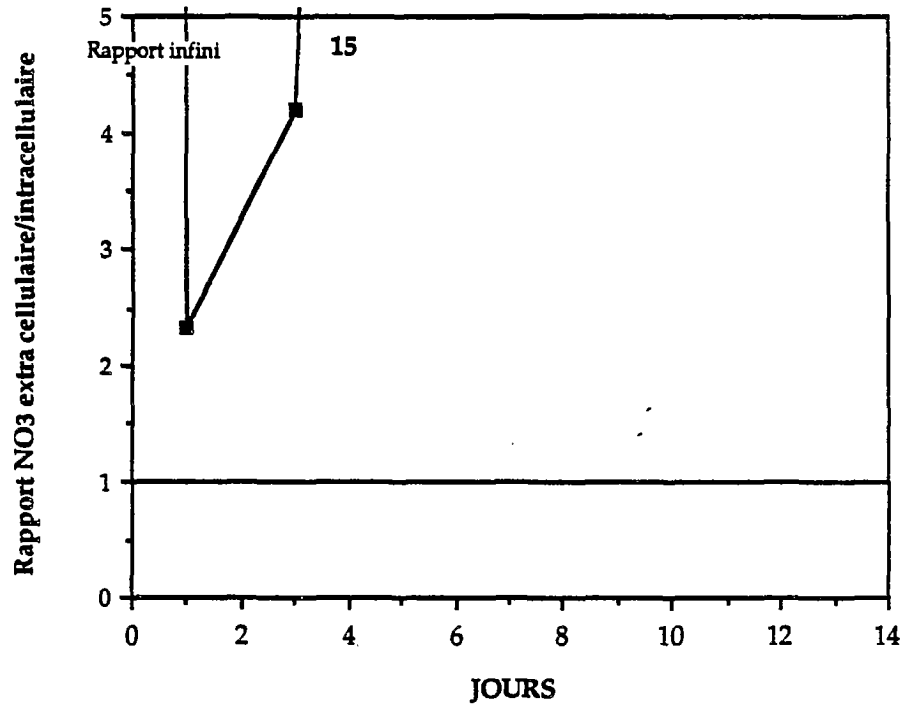


Figure n° 38 : Evolution des minéraux endo et exocellulaires (suspension photomixotrophe en fiole)

EVOLUTION DU RAPPORT NO₃ EXTRA/INTRACELLULAIRE
Suspension photomixotrophe en fioles



EVOLUTION DU RAPPORT NH₄ EXTRA/INTRACELLULAIRE
Suspension photomixotrophe en fioles

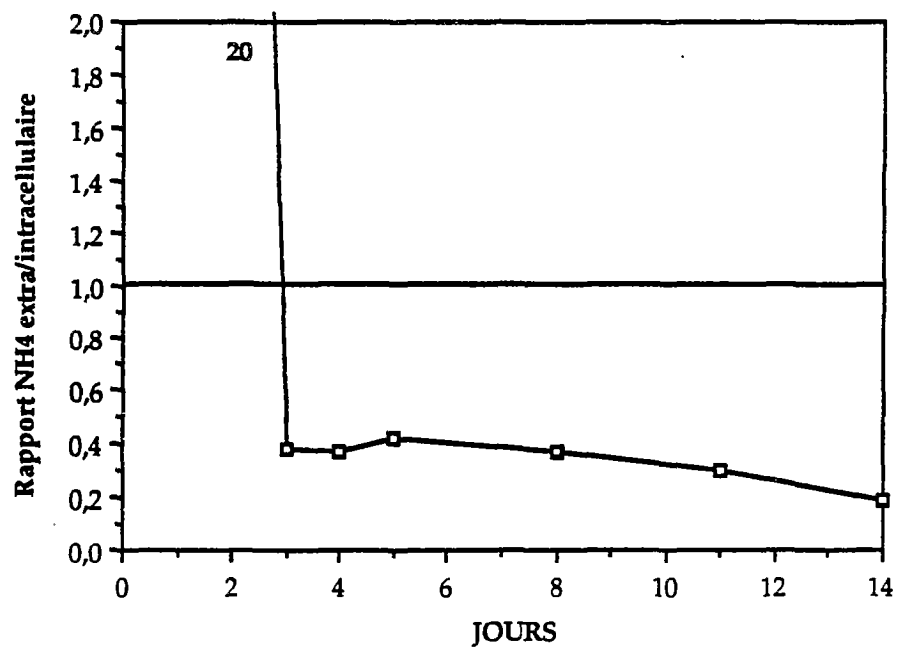


Figure n° 39 : Evolution des rapports extra/intracellulaire pour le nitrate et l'ammonium (suspension photomixotrophe en fiole)

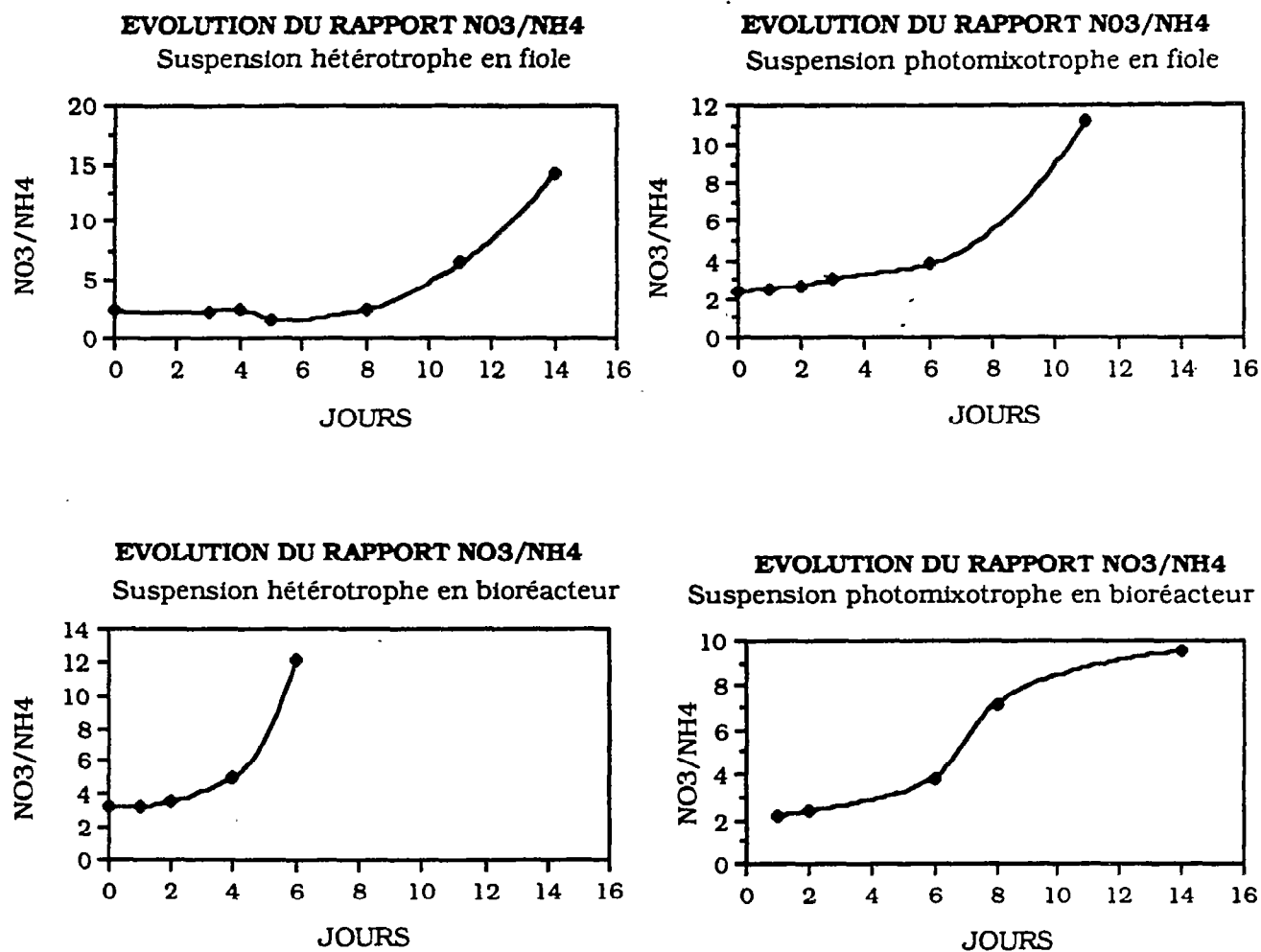


Figure n° 40 : Evolution comparée des rapports NO_3/NH_4

suspensions de *Rosa* cultivées en alimentation azotée mixte ($\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$)

La teneur en ammonium interne mesurée sur nos cultures apparaît très importante, voisine du seuil de toxicité pour la cellule de cet ion minéral. Le résultat décrit ici résulte de mesures réalisées sur une seule culture, par manque d'extrait intracellulaire, il convient donc de le considérer avec prudence. Afin de confirmer ou non ce résultat inhabituel, il importe de renouveler ce dosage sur des cultures du même type, avec la même méthode colorimétrique. De plus, d'autres méthodes de dosage pourraient être testées : par électrode spécifique à NH_4^+ (MERILLON *et al.* - 1983) ou bien par HPLC sur résine échangeuse d'ions (SARROBERT *et al.* - 1989).

c) Evolution du rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$:

Le rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ dans le milieu reste constant au cours de la phase exponentielle de croissance, ceci pour les quatre types de culture étudiés. Durant cette période, on assiste donc à une consommation simultanée, et dans les mêmes proportions, des formes minérales réduites et oxydées de l'azote.

En fin de culture, ce rapport croît intensément, à cause de l'épuisement des réserves en ammonium dans le milieu.

Il semble donc que, pour notre matériel végétal, les deux voies d'incorporation de l'azote fonctionnent indépendamment. La vitesse de consommation des nitrates n'est jamais influencée par celle des ions ammonium.

c) Comparaison et discussion :

Ces données confirment les résultats obtenus par BAYLEY *et al.* (1972), indiquant une utilisation concomitante des deux nutriments azotés durant la phase exponentielle de croissance des cellules.

D'autres auteurs, au contraire, décrivent, chez différentes espèces, une utilisation séquentielle du nitrate ou de l'ammonium par les suspensions cellulaires. (VELIKY & ROSE - 1973 ; BRASSART *et al.* - 1978 ; SARGENT & KING - 1973)

Il ressort clairement de la revue bibliographique de DOUGALL (1980) qu'un grand nombre de cultures cellulaires montrent une utilisation préférentielle des formes réduites de l'ammonium par rapport au nitrate.

Nous verrons par la suite les précautions à prendre lors de l'exploitation de ces données. L'épuisement rapide des réserves en ammonium est souvent interprété comme une consommation préférentielle pour cet ion.

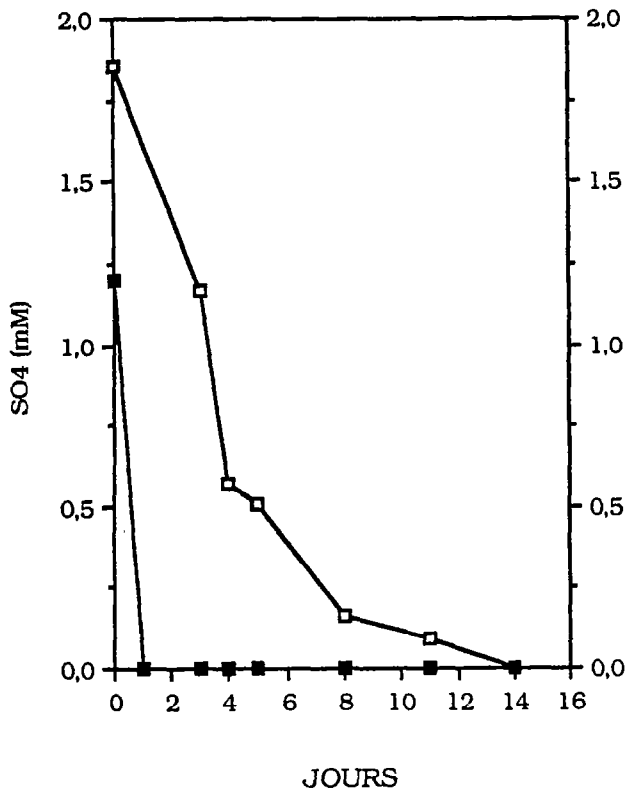
La concentration initiale en NH_4^+ par rapport au NO_3^- doit être prise en compte, et l'expression de la consommation en vitesse de disparition par unité de biomasse permet souvent d'autres interprétations.

3) Cinétique de consommation des ions sulfate :

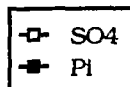
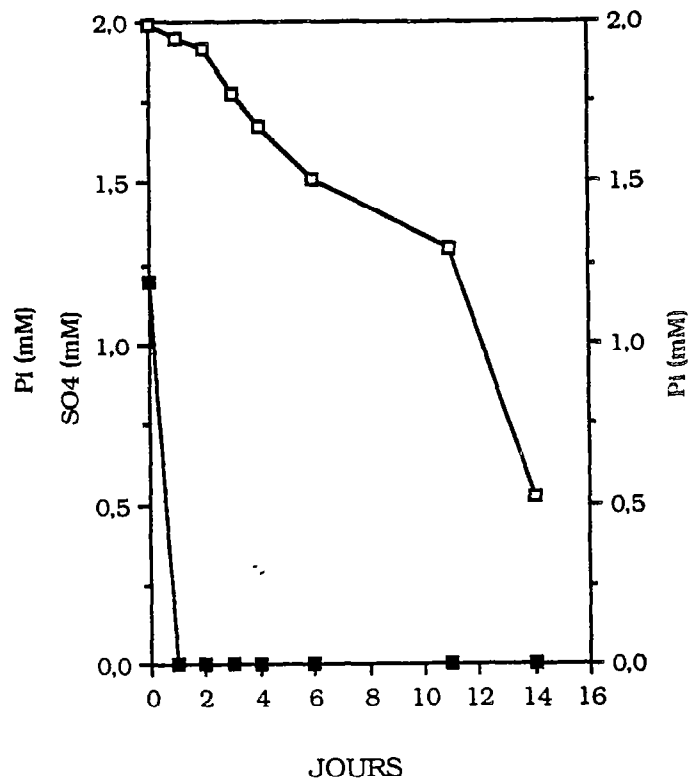
a) Résultats : (Figure n° 41)

Nota : La méthode de dosage néphélométrique des sulfates utilisée requiert la disponibilité de 3 ml au minimum d'extrait intracellulaire. Les cellules récoltées à chaque prélèvement étant utilisées pour de nombreuses analyses (voir le protocole de dosage en Annexe C; §D), il ne nous a pas été possible d'effectuer des dosages intracellulaires de sulfates sur nos prélèvements.

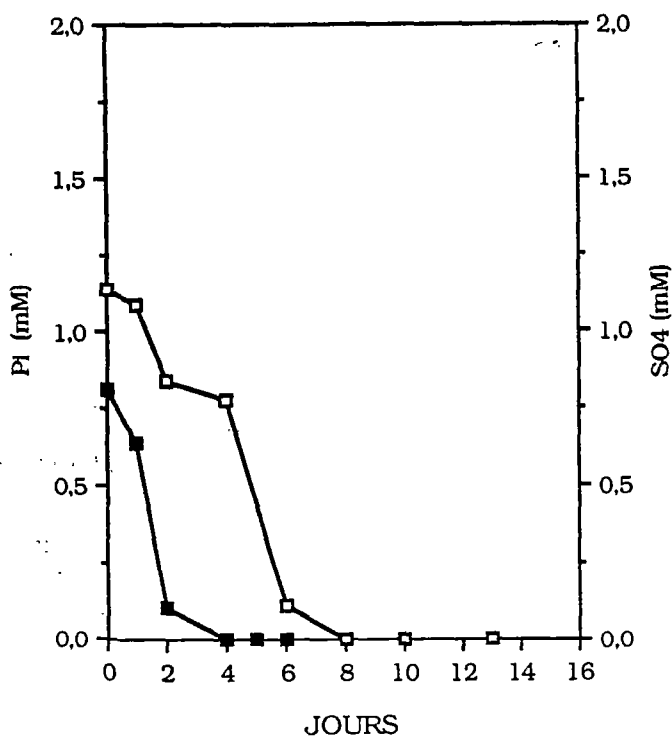
EVOLUTION DES SULFATES ET DU PI
Suspension hétérotrophe en fioles



EVOLUTION DES SULFATES ET DU PI
Suspension photomixotrophe en fiole



EVOLUTION DES SULFATES ET DU PI
Suspension hétérotrophe en bioréacteur



EVOLUTION DES SULFATES ET DU PI
Suspension photomixotrophe en bioréacteur

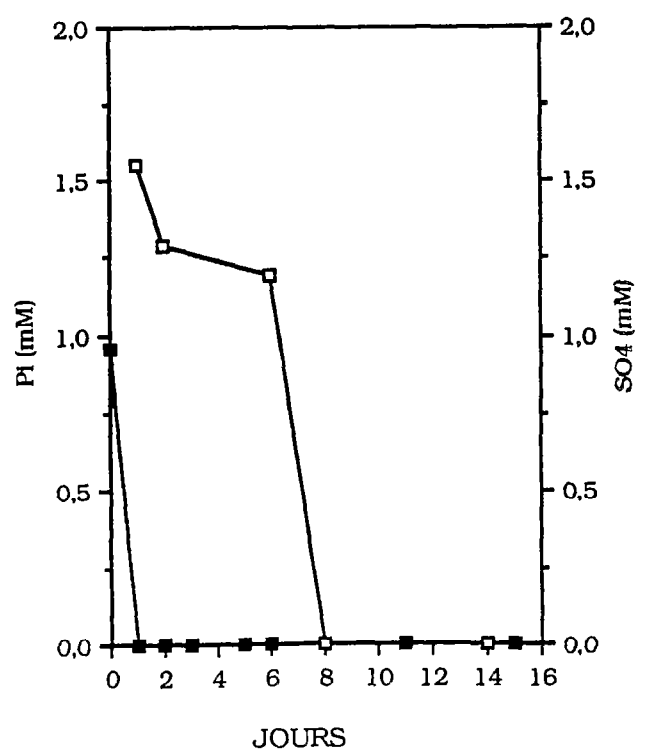


Figure n° 41 : Evolution comparée du Pi et des sulfates exocellulaires

Concernant l'évolution des sulfates dans le milieu, les courbes obtenues pour les quatre types de suspensions étudiées mettent en évidence une consommation rapide des ions SO_4^{2-} . En effet, chez les deux types de suspensions cultivées en bioréacteur, les sulfates ont totalement disparu du milieu après 8 jours de culture.

En fioles d'Erlenmeyer, la consommation semble moins rapide. En effet, le pool en sulfates apportés dans le milieu s'épuise à partir du 14^e jour seulement dans la culture hétérotrophe ; chez les suspensions mixotrophes, on retrouve 0,5 mM environ en sulfates résiduels à la fin de la culture. Il faut dans ce cas remarquer que la concentration initiale en sulfates mesurée (2,0 mM environ) est légèrement supérieure à la valeur théorique attendue (1,5 mM +/- 0,25). Cette erreur doit sans doute être attribuée à un dosage défectueux lors de la préparation des milieux de culture.

Quoi qu'il en soit, les cinétiques de consommation semblent différer suivant le type de cellules considéré.

- chez les cultures hétérotrophes, la consommation en sulfates est rapide, et intense, dès les premiers jours de culture.

- chez les cellules photomixotrophes, les prélèvements dans le milieu par la suspension apparaissent à la fois plus lents, et plus réguliers.

b) Comparaison et discussion :

Considérant les teneurs en SO_4^{2-} dans le milieu, les sulfates pourraient jouer un rôle de facteur limitant de la croissance pour notre matériel végétal, excepté peut-être chez les suspensions photomixotrophes en fioles.

Il est intéressant de remarquer que le milieu de MURASHIGE & SKOOG (1962), est l'une des solutions nutritives les plus pauvres en sulfates : il en contient 1,5 mM contre 4,4 mM dans le milieu de WHITE (1939), 2 mM dans le milieu de GAMBORG B5 (GAMBORG & EVELEIGH - 1968).

Pour notre matériel végétal, la teneur optimale en SO_4^{2-} ne doit pas excéder 2 mM. En effet, au-delà de cette teneur, des sulfates excédentaires, non incorporés, se retrouvent dans le milieu en fin de culture.

Dans la cellule végétale, le soufre sous forme oxydée intervient en fournissant un groupement acide stable à de nombreuses molécules organiques, augmentant ainsi leur solubilité (flavonoides -sulfates par exemple).

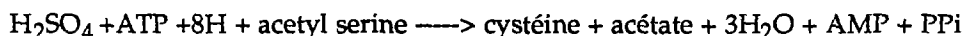
Les groupements sulfhydryl (SH) jouent un rôle considérable dans le métabolisme cellulaire : ils peuvent constituer les sites actifs d'enzymes ou de coenzymes (CoA), participer directement à des réactions de type redox, intervenir dans la conformation des protéines (ponts disulfures), ou les hétérocycles de nombreuses molécules organiques importantes (thiamine, biotine). (CLARKSON & HANSON - 1980)

Par ailleurs, les groupements SH jouent un rôle protecteur vis à vis des radicaux libres toxiques dans la cellule.

Le soufre est, enfin, un, constituant essentiel des protéines, *via* les acides aminés soufrés tels que cystéine et méthionine.

La première étape dans l'incorporation des sulfates est assurée par l'ATP Sulfurylase (EC 2, 7, 7, 4) qui catalyse la formation d' adenosine-5'-phosphosulfate (APS) et de Pi à partir d'ATP et de SO_4^{2-} . Cette activité a pu être mise en évidence par REUVENY & FILNER (1976) sur des suspensions cellulaires de Tabac. Le groupement sulfuryl de l'APS est ensuite transféré sur l'acetyl sérine, via un complexe transporteur. Le premier produit de la réduction des sulfates, localisée dans le chloroplaste, est la

cystéine (MENGEL & KIRKBY - 1987). Le bilan de ce cycle de réduction des sulfates peut s'écrire comme suit:



La réduction des sulfates peut donc être régulée par la disponibilité en ATP (*via* la charge énergétique) dans la cellule.

De plus, pour de nombreux auteurs (Revue bibliographique de MENGEL & KIRKBY - 1987) l'absorption et la translocation des sulfates fait appel à un transport de type actif, dirigé contre un gradient électrochimique. Ainsi LIN (1981), étudiant la consommation en sulfates de fragments racinaires et de protoplastes de maïs, montre que les prélèvements en SO_4^{2-} dans le milieu sont augmentés si le pH décroît. L'auteur suggère un mécanisme de transport par cotransport $\text{H}^+ / \text{SO}_4^{2-}$ ou antiport $\text{OH}^- / \text{SO}_4^{2-}$, mettant en jeu un transporteur protéique au niveau du plasmalemme. Le pH exocellulaire peut apparaître alors comme un régulateur efficace de l'absorption des sulfates. Dans les cultures cellulaires, le pH acide souvent mesuré va dans le sens d'un transport plus aisé des sulfates.

A notre connaissance, peu de données sont actuellement disponibles, concernant la nutrition soufrée des suspensions cellulaires végétales ; il est alors difficile de pouvoir efficacement comparer nos résultats.

HALLER *et al.* (1986) étudient, sur de suspensions cellulaires de *Rosa*, les relations entre les activités nitrate réductase, APS et Adenosine 5' phosphosulfate sulfotransferase (APSSTase). A la lumière de cette étude, l'APSSTase apparaît comme l'enzyme responsable de la régulation de l'assimilation du soufre à cause de son inducibilité par les sulfates, et sa très grande sensibilité aux facteurs externes.

Dans les mêmes conditions (modifications de la teneur en sulfates ou en nitrates du milieu) l'APS présente des variations d'activité beaucoup moins importantes.

4) Cinétique de consommation du phosphore inorganique :

a) Résultats : (Figure n° 41)

Les quatre types de suspensions étudiés présentent une cinétique de consommation du phosphore inorganique semblable. La totalité du pool disponible est consommé en moins de 24 heures.

Ce résultat vient confirmer les observations de nombreux auteurs : KNOBLOCH *et al.* (1981) sur des cellules de *Nicotiana tabaccum*, WILLEGALLA *et al.* (1985) sur des cultures cellulaires de *Datura innoxia*, CHAGVARDIEFF *et al.* (1988) sur *Euphorbia characias* observent également une disparition rapide du Pi dans le milieu. Beaucoup d'auteurs considèrent alors que le Pi ne peut être un facteur limitant de la croissance, puisque la suspension continue à croître alors que le Pi est épuisé dès le début de la culture.

A l'inverse, AGIER *et al.* (1983) montrent que le phosphore apporté par la solution de MURASHIGE & SKOOG est limitant pour la croissance de suspensions hétérotrophes. On a pu établir une relation linéaire entre la teneur initiale en Pi du milieu, et le nombre de cellules mesuré en phase stationnaire. Ces auteurs ont pu ainsi obtenir des cultures de cellules synchrones, en les plaçant en conditions phosphate-limitantes. La croissance de la suspension est alors étroitement indexée sur le Pi disponible dans le milieu.

Les travaux concernant l'optimisation du taux en Pi des milieux de culture ont fourni des résultats très variables en fonction de l'espèce considérée. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que des concentrations en Pi supérieures à 2 mM inhibent la croissance

cellulaire (MURASHIGE & SKOOG - 1962; GAMBORG & EVELEIGH - 1968)

Par ailleurs, d'autres auteurs montrent qu'une inhibition de la croissance n'apparaît qu'à des concentrations en Pi 10 fois supérieures (REBEILLE *et al.* - 1982).

Ainsi, pour De-EKNAMKUL & ELLIS (1985) l'augmentation du taux en Pi initial améliore la croissance d'une suspension d'*Anchusa officinalis* jusqu'à 3 mM, et reste sans effet supplémentaire jusqu'à 10 mM.

KATOH *et al.* (1980) proposent une solution minérale de type M. & S. modifiée pour la culture de suspensions photomixotrophes de *Marchantia polymorpha*. Cette solution présente une teneur en Pi de 3,13 mM (au lieu des 1,25 mM du milieu M. & S.). KATOH *et al.* montrent une augmentation du taux de croissance corrélée avec l'enrichissement en Pi du milieu. A 3,75 mM, le phosphate forme un précipité jaunâtre à l'autoclavage, et devient inaccessible à l'incorporation, confirmant les observations de DALTON *et al.* (1983).

Sur notre matériel végétal (suspensions photomixotrophes d'*Abrus precatorius*), I. HARDY-CLARIS (communication personnelle) a montré que des teneurs en Pi initial jusqu'à 4 mM restaient sans effet significatif sur la croissance et la chlorophyllogénèse des cellules.

b) Evolution des concentrations intracellulaires : (Figure n° : 38)

Nous avons suivi, avec I. HARDY-CLARIS (1988), l'évolution du Pi interne dans les quatre types de cultures étudiées. Dans tous les cas, le phosphore inorganique, transitoirement accumulé, probablement dans la vacuole durant la phase exponentielle de croissance, est très rapidement ramené à la concentration minimale d'environ 3 mM dès la fin de la phase exponentielle.

Malgré cette teneur non négligeable, le Pi pourrait constituer un facteur limitant de la croissance et du métabolisme des cellules photomixotrophes et hétérotrophes d'*Abrus*.

Pour WRAI & BRICE (1973) et REBEILLE *et al.* (1982), la vacuole serait le lieu privilégié de stockage du phosphore inorganique. Ce compartiment joue un rôle fondamental en maintenant une homéostasie satisfaisante du Pi cytoplasmique. ROBINS & RATCLIFFE (1984) montrent que le niveau de Pi et le pH cytoplasmiques restent constants dans des suspensions cellulaires d'*Humulus lupulus* mises en présence d'une large gamme de concentrations extracellulaires de Pi (1,25 à 51 mM). Ainsi, les caractéristiques cytoplasmiques ne sont pas perturbées, même à des concentrations inhibitrices pour la croissance cellulaire, grâce au stockage vacuolaire du Pi en excès.

On a pu montrer que, même pour des faibles concentrations en Pi externe, les cellules végétales cultivées *in vitro* sont capables d'accumuler le phosphore inorganique jusqu'à des taux équivalents à 60 mM. (KNOBLOCH *et al.* - 1981, KNOBLOCH - 1982).

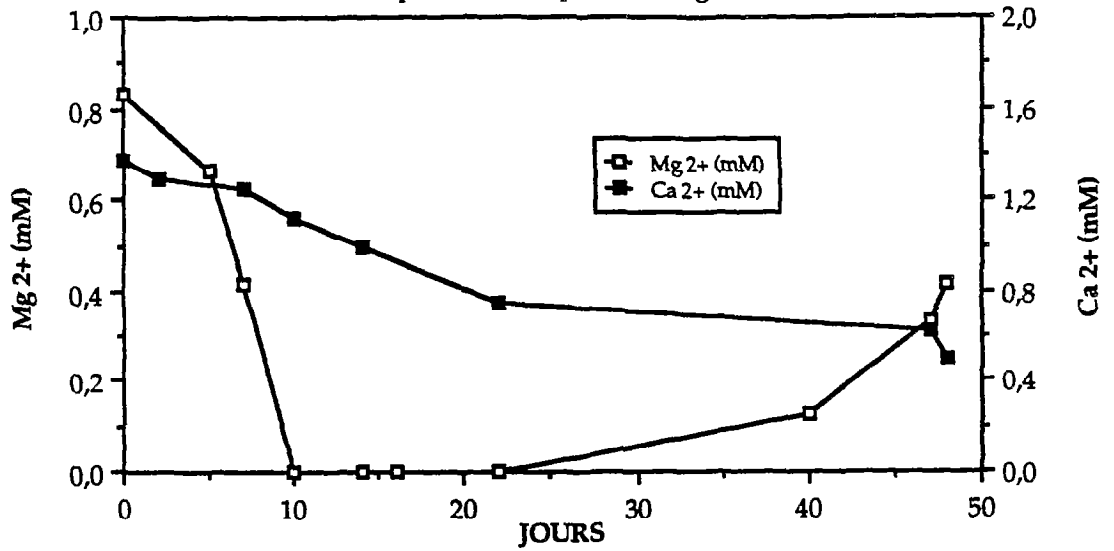
JACKSON & HAGEN (1960) montrent que dans des racines, 80 % des phosphates absorbés est incorporé dans des molécules organiques moins de 10 minutes après l'absorption. Les premiers composés formés sont principalement les hexoses phosphates et l'uridine diphosphate.

c) Discussion :

Le Phosphore inorganique est un constituant essentiel de nombreuses molécules intervenant directement dans le métabolisme cellulaire : ADN, ARN, phospholipides, nucléotides, sucres-phosphates. De plus, il est clairement établi que le Pi agit (*via* la modulation de la charge énergétique), comme un régulateur énergétique fondamental du

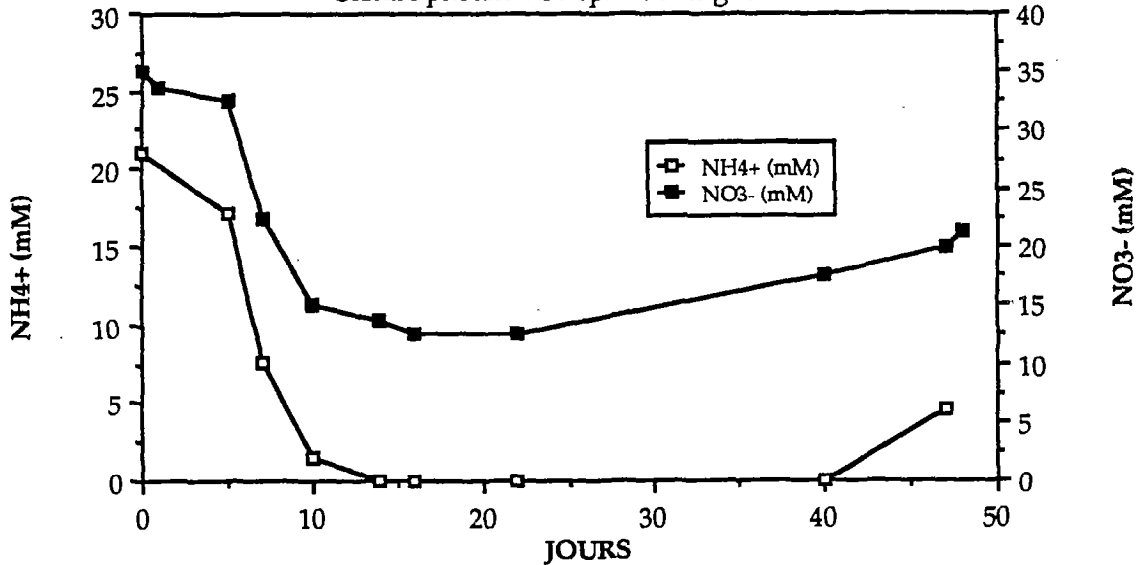
Evolution du calcium & du magnésium

Cultures photomixotrophes de longue durée



Evolution du nitrate & de l'ammonium

Culture photomixotrophe de longue durée



Evolution du potassium

Culture photomixotrophe de longue durée

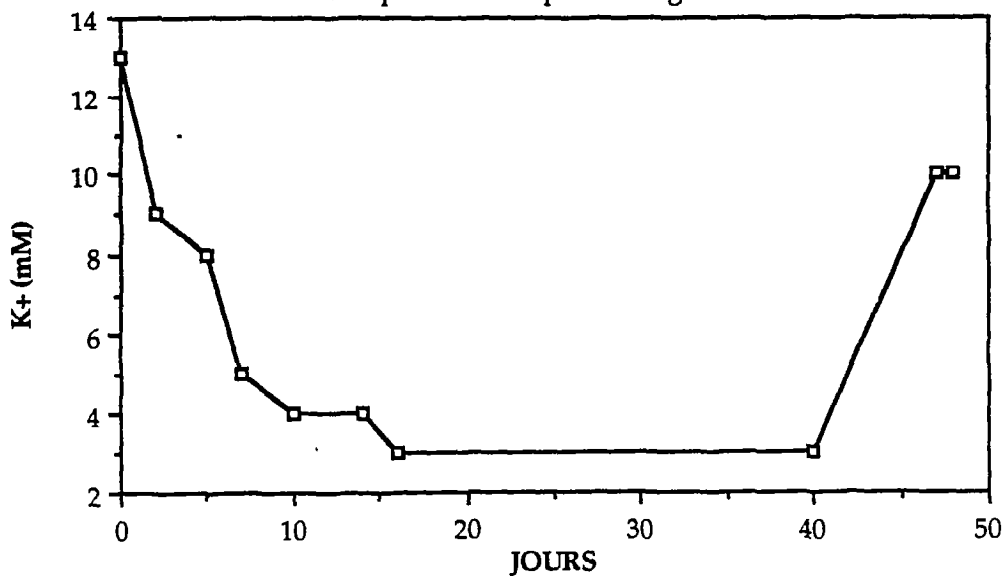


Figure n° 42 : Evolution de quelques composés minéraux au cours d'une culture photomixotrophe de longue durée

métabolisme cellulaire.

Sur notre matériel végétal, I HARDY-CLARIS (1988) s'est intéressée à l'évolution des nucléotides adényliques intracellulaires. Chez les cultures photomixotrophes et hétérotrophes, tant en réacteur qu'en fioles d'Erlenmeyer, les nucléotides adényliques totaux subissent une augmentation considérable au cours de la phase exponentielle de croissance, concomitante avec une augmentation du taux en P_i intracellulaire. Ce phénomène se traduit également par une nette augmentation du rapport ATP/ADP, (l'AMP reste constant).

Le rôle du P_i dans la régulation de la charge énergétique dans la cellule végétale est désormais clairement établi. ASHIHARA & UKAJI (1986) montrent, sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* que le l'incorporation précoce (8 heures après ensemencement) du P_i induit, dans la cellule, une augmentation importante du pool total en adénylates avec un maximum pour une concentration en P_i externe de 20 mM. Ces résultats viennent étayer les hypothèse de MIGINIAC *et al.* (1981) qui proposent pour le P_i un rôle de régulateur dans le niveau d'adénylates et la différenciation chloroplastique.

L'augmentation du taux en ATP n'étant pas accompagnée d'une évolution correspondante en ADP et en AMP, de nombreux auteurs l'attribuent à une synthèse préférentielle *de novo* d'ATP. Néanmoins, la question de l'effet du P_i sur la biosynthèse des purines dans la cellule végétale n'est toujours pas résolue (ASHIHARA & UKAJI - 1986) .

5) Cas des cations : Calcium, potassium, magnesium : (Figure n° 42)

Nota : Les résultats obtenus doivent être interprétés avec prudence, car ils concernent une culture unique, réalisée en début d'étude, avec une suspension non encore stabilisée.

Nous avons conduit, sur la lignée d'*Abrus precatorius* 6H photomixotrophe, une culture en erlen sur 60 jours, conduisant ainsi la suspension cellulaire jusqu'à un état de senescence aisément caractérisable (dépigmentation, forte proportion de cellules mortes, apparition d'activités peroxydases dans le milieu de culture).

Au cours de cette expérimentation, l'évolution des principaux cations (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) ont été analysés. Malheureusement, les contraintes liées à la sous-traitance de ces données par un laboratoire extérieur ne nous ont pas permis de systématiser ces analyses et de les appliquer à toutes les cultures.

Le calcium et le potassium ne sont que très faiblement consommés par la culture. Malgré leur faible teneur initiale, ils n'apparaissent jamais limitants pour la croissance de la suspension. Le potassium est relargué dans le milieu lors de la senescence de la suspension, à partir du 38° jour suite, probablement, à une importante lyse cellulaire.

Par contre, le magnesium disparaît du milieu après 10 jours de culture, puis redevient dosable à partir du 38° jour. On peut penser que ce cation, effecteur connu de plusieurs systèmes enzymatiques fondamentaux (notamment la Rubisco), soit mobilisé au cours de la phase exponentielle de croissance, lorsque le métabolisme cellulaire est à son plus haut niveau d'activité. Il serait alors stocké dans la vacuole et distribué vers le cytoplasme. On le retrouverait ensuite dans le milieu à la suite de la décompartimentation cellulaire accompagnant la senescence de la cellule.

Il est intéressant de noter que le calcium ne réapparaît pas dans le milieu en fin de culture. Cet élément serait vraisemblablement immobilisé pour partie dans les structures membranaires dont il assure la cohésion.

Mc CARTHY *et al.* (1980) décrivent, pour une suspension cellulaire hétérotrophe de *Catharanthus roseus*, une faible consommation en calcium et potassium, mais une chute importante du taux en Magnesium au cours d'une culture en fioles agitées.

HENRY *et al.* (1981) montrent, sur des cultures cellulaires de *Silene alba* que la teneur en cations majeurs (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) décroît progressivement, mais n'atteint jamais des valeurs qui pourraient être limitantes pour la croissance.

KATOH *et al.* (1980) notent une consommation importante des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} dans des cultures photomixotrophes de *Marchantia polymorpha*. Cette consommation est très faible au cours de la phase exponentielle, puis s'accroît nettement lorsque la biomasse de la culture se stabilise. Ces auteurs relient cette consommation aux modifications du pH exocellulaire, qui s'alcalinise sensiblement durant cette dernière période.

Certains cations (K^+ , Na^+) semblent jouer un rôle d'accompagnement pour d'autres nutriments minéraux, et interviennent dans les phénomènes osmotiques et d'équilibre de charges électriques (Equilibre de DONNAN) entre la cellule et son milieu extérieur. Potassium et sodium n'ont pas, à proprement parler, de rôle plastique dans la cellule végétale (MENGEL & KIRKBY - 1987).

Le potassium intervient principalement dans quatre processus physiologiques : l'activation d'enzymes (Rubisco), les transports membranaires, la neutralisation des anions et le potentiel osmotique.

En outre, le potassium semble fortement impliqué dans la croissance des méristèmes (MENGEL & KIRKBY - 1987). Au cours de la croissance, l'expansion des cellules est caractérisé par une sortie de H^+ hors du cytoplasme et une entrée concomitante de K^+ , via l'action d'une ATP ase, conduisant à une dépolarisation du potentiel plasmalemmique. (JACOBI *et al.* - 1973)

De plus, il apparaît, à la lumière de nombreux travaux, que le potassium montre une action synergiste avec les phytohormones impliquées dans la croissance et le développement : acide indol acétique - AIA (COCCUCI & DELLA ROSA - 1980), cytokinines (GREEN - 1983)...

Pour SCHERER *et al.* (1982) cette action du potassium sur la croissance des cellules méristématiques apparaît comme l'effet le plus important qu'exerce ce cation sur le métabolisme cellulaire.

Le sodium apparaît, chez les plantes supérieures, comme un élément plus fonctionnel qu'essentiel (CLARKSON & HANSON - 1980). Les teneurs apportées par les milieux nutritifs sont, dans la majorité des cas, largement excessives par rapport aux besoins réels de la cellule.

Le calcium, outre son rôle fondamental dans l'équilibre des charges lors des échanges ioniques, intervient dans la stabilisation des membranes des cellules végétales.

Ce cation joue, par sa divalence, un rôle important dans la cohésion des édifices polymoléculaires, ou des macromolécules protéiques. Il intervient donc directement dans les grandes voies métaboliques en maintenant l'intégrité de la compartimentation subcellulaire.

En outre, l'ion calcium, via la calmoduline, a été récemment impliqué dans les phénomènes d'embryogénèse somatique chez la carotte. (TIMMERS - 1989)

De plus, certains cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) interviennent, à très faible concentration, dans la catalyse ou la structure quaternaire de systèmes enzymatiques importants (carboxylases, ATPases, NAD Kinase...).

Nous avons décrit, au cours de cultures d'*Abrus* maintenues sans renouvellement de milieu sur une longue période (60 jours), un relargage de certains éléments. Ce phénomène est dû vraisemblablement à la décompartimentation et à la lyse cellulaires liées à la sénescence de la population, ou à la destructuration de métabolites complexes, recyclés par la cellule. Il s'agit du Pi, des cations potassium, magnésium, et nitrate. Par contre, les sulfates n'ont jamais été retrouvés dans le milieu en fin de culture ; le SO_4 pourrait être incorporé définitivement dans le métabolisme cellulaire *via* la cystéine.

Ce phénomène est décrit également par MERILLON *et al.* (1983) sur des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* dans lesquelles ammonium et phosphates sont à nouveau détectables dans le milieu après 15 jours de culture. De même, Mc CARTHY *et al.* - 1980) sur *Catharanthus roseus* également, notent une réapparition d'une grande partie des éléments minéraux en fin de culture (après 14 à 22 jours) : nitrates, sulfates, ammonium, sodium, potassium.

Dans la cellule végétale, l'absorption des nutriments minéraux ne se traduit pas obligatoirement par une incorporation immédiate. Le compartiment vacuolaire intervient souvent en tant que lieu de stockage intermédiaire des éléments minéraux, jouant un rôle-tampon, fondamental dans la régulation du métabolisme cytoplasmique (MATILE - 1978 ; MARIN - 1986).

Cette fonction a été clairement mise en évidence pour le Phosphore inorganique (REBEILLE *et al.* - 1982), les nitrates (FERRARI *et al.* - 1983, ROBIN *et al.* - 1983), le potassium (MENGEL & KIRKBY - 1987), le calcium (MARME - 1983)...

6) Discussion générale et relation avec divers paramètres physiologiques :

Le tableau présenté ci-dessous donne les vitesses de consommation des principaux nutriments minéraux pour chaque type de culture.

La vitesse est exprimée en micromole . jour⁻¹ . g PMF⁻¹. Elle est calculée entre le jour d'inoculation (Jo) et le dernier jour de culture, ou entre Jo et le jour où l'élément considéré est totalement épuisé dans le milieu.

$$\text{VMC} = \frac{\Delta C}{\Delta \text{PMF} \times \Delta J} \quad (\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{PMF})$$

où ΔC représente la variation en concentration de l'élément E, en mM,
 ΔJ représente l'intervalle de mesure en jours (*défini ci-dessus*), et
 ΔPMF représente l'accroissement en biomasse pour l'intervalle de temps considéré, en g.l⁻¹.
 VMC représente alors l'expression de la vitesse moyenne de consommation de l'élément E.

Cette expression permet de prendre en compte les différences dans l'accroissement en biomasse, qui ne sont pas mises en évidence sur les courbes de consommation présentées précédemment.

Pour le phosphore inorganique, un tel calcul est irréalisable, la totalité de l'élément étant assimilée dans les premières heures de la culture. Notre premier prélèvement ayant lieu 24 heures après l'inoculation, l'expression de la vitesse n'aurait pas de signification réelle.

Il est important de pouvoir comparer rigoureusement les vitesses de disparition des nutriments dans le milieu. Une interprétation purement graphique peut parfois conduire à une interprétation erronée des résultats. Les différences importantes dans les concentrations initiales des différents éléments rendent hasardeuses les comparaisons de

plusieurs cinétiques sur un même graphique.

Ainsi, BAYLEY et ses collaborateurs (1972) décrivent une consommation "plus rapide" d'ammonium (par rapport au nitrate) dans des suspensions cellulaires, à partir d'une lecture graphique, alors que les calculs de vitesse donnent un résultat beaucoup moins marqué. Dans le milieu GAMBORG B₅ (GAMBORG & EVELEIGH - 1968) utilisé par ces auteurs, les concentrations initiales des deux éléments diffèrent d'un facteur 10, et les échelles graphiques d'autant! Il est alors aisé de confondre les notions d'épuisement rapide des ressources du milieu en un composé, et consommation préférentielle pour ce composé.

Nous avons donc introduit une notion de **vitesse moyenne de croissance (VMC)** capable de prendre en compte l'accroissement en biomasse de la population cellulaire pour l'intervalle de temps durant lequel est estimée la disparition d'un nutriment. Son principal défaut reste de ne donner qu'une caractéristique globale de la consommation minérale. Elle ne remplace en aucun cas l'approche cinétique, qui permet de mettre en évidence d'éventuelles phases différentes dans la consommation, mais la complète en attribuant à un type de culture une grandeur mesurable.

Cette notion est à rapprocher du calcul, pour la biomasse, du taux de croissance μ_{MAX} , qui ne renseigne en aucun cas sur l'allure d'une courbe de croissance mais permet de comparer correctement divers types de cultures (cellules isolées ou microorganismes).

Ces mesures de vitesses, bien que peu précises, fournissent néanmoins quelques indications sur l'intensité du métabolisme primaire (nutrition minérale) dans les différents types de cultures. Elles vont nous permettre de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les quatre types de cellules étudiées.

	Suspension hétérotrophe en fioles	Suspension photomixotrophe en fioles	Suspension hétérotrophe en bioréacteur	Suspension photomixotrophe en bioréacteur
NO ₃	5,4	7,5	25,7	23,8
NH ₄	4,4	6,6	12,9	30,7
SO ₄	1,2	1,0	1,5	3,4

Tableau n° 9: Comparaison des vitesses de consommation pour les ions nitrate, ammonium et sulfate (en $\mu\text{mole} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{PMF}$)

A la lecture de ce tableau, il apparaît nettement que :

1) Les cultures en bioréacteur, pour un même type de culture (hétéro ou mixotrophe) montrent une vitesse de consommation pour tous les ions nettement supérieure, même si, pour les ions nitrates et ammonium, cette consommation a lieu seulement durant les premiers jours de culture. Ce phénomène est très marqué en ce qui concerne la consommation en nitrates pour laquelle le transfert fiole/réacteur se traduit par une multiplication par 5 environ (cellules hétérotrophes) ou par 3 (cellules photomixotrophes) des vitesses. Pour l'ammonium, ces différences dans les vitesses de consommation sont du même ordre.

2) D'autre part, les cultures cellulaires photomixotrophes présentent le plus souvent, des vitesses d'absorption des ions supérieures à celles des cultures hétérotrophes placées dans les mêmes conditions de culture.

Les deux types de cultures en réacteur (mixo & hétérotrophes) montrent la même vitesse de consommation pour le nitrate. Concernant la consommation en ions NH_4^+ et

	SUSPENSION HETEROTROPHE EN FIOLES	SUSPENSION PHOTOMIXOTROPHE EN FIOLES	SUSPENSION HETEROTROPHE EN BIOREACTEUR	SUSPENSION PHOTOMIXOTROPHE EN BIOREACTEUR
Taux de croissance (μ)	0,14	0,24	0,16	0,14
Temps de doublement (jour)	5	3	4,5	5
Productivité en biomasse (g. PMS . jour ⁻¹ . litre ⁻¹)	0,95	0,55	0,7	0,53
Intensité respiratoire maximale à l'obscurité (μ moles O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹ PMS)	138	290	120	380
Intensité photosynthétique maximale (μ moles O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹ PMS)	-	90	-	40
Chlorophylles totales (μ g.g ⁻¹ PMS)	-	1,1	-	0,7
Rendement de conversion du saccharose (%)	44	60	47	36
Protéines solubles (mg. g ⁻¹ PMF)	2,35	1,75	2	1,5
Vitesse de consommation du nitrate (μ moles . jour ⁻¹ . g ⁻¹ PMF)	5,4	7,5	25,7	23,8
Vitesse de consommation de l'ammonium (μ moles . jour ⁻¹ . g ⁻¹ PMF)	4,4	6,6	12,9	30,7
Vitesse de consommation des sulfates (μ moles . jour ⁻¹ . g ⁻¹ PMF)	1,2	1	1,5	3,4

Tableau n° 8 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DU METABOLISME PRIMAIRE
(BIOMASSE & NUTRITION MINERALE)

SO_4^{2-} , les différences sont plus nettes : Les cellules photomixotrophes en bioréacteur ont des vitesses de consommation pour ces ions plus de deux fois supérieure à celles des cellules hétérotrophes dans le même système de culture. Les deux types de cellules (hétéro et mixotrophes) montrent des courbes de consommation en nitrate quasiment similaires, mais l'accroissement en biomasse au cours de la culture est faible chez les cellules mixotrophes. Ces cellules (photomixotrophes en fiole) sont les seules à montrer une vitesse de consommation plus importante pour l'ammonium que pour les nitrates, alors qu'on remarque le contraire pour les cellules hétérotrophes, où la VMC pour le NO_3^- est deux fois plus forte que pour le NH_4^+ .

Concernant les cultures en fioles, la vitesse de consommation du nitrate est toujours supérieure à celle calculée pour l'ammonium. Cette différence est plus marquée chez les cellules mixotrophes (+23 % au lieu de +13 %). La culture photomixotrophe en fiole présente, pour le nitrate et l'ammonium, une affinité supérieure à celle de la culture hétérotrophe, cette différence étant quasiment nulle en ce qui concerne les sulfates.

En bioréacteur, les sulfates semblent être incorporés plus rapidement dans les cellules photomixotrophes. La première étape de la réduction des sulfates étant vraisemblablement chloroplastique (AMP sulfurylase), on peut supposer que la présence de chloroplastes fonctionnels dans les cellules photomixotrophes puisse favorablement influencer la consommation en SO_4 . La disponibilité en AMP (substrat de la réaction) *via* la charge énergétique cellulaire pourrait également moduler l'efficacité de la réduction des sulfates.

Chez des cultures cellulaires d'*Abrus*, I HARDY-CLARIS (1988) a suivi l'évolution, des nucléotides adényliques intracellulaires (Voir Annexe D;). Il apparaît, au vu de cette étude, que la mise en culture des cellules dans un milieu neuf induit une nette augmentation du pool total en nucléotides adényliques, due vraisemblablement à une néosynthèse importante d'Adenosine monophosphate. Ce phénomène a pu être mis en évidence dans tous les types de cultures (hétéro/mixotrophes ; fiole/bioréacteur).

Un tel résultat vient compléter utilement nos informations : en début de culture, l'incorporation des sulfates peut avoir lieu dans des conditions optimales, du moins en ce qui concerne la disponibilité en substrats pour l'AMP Sulfurylase.

En outre, il est très intéressant de remarquer que le pool total en adénylates (ATP+ADP) est nettement supérieur dans les cellules photomixotrophes que dans les cellules hétérotrophes. Il atteint respectivement, pour les cultures en bioréacteur, les valeurs maximales de 1 600 nanomoles. g^{-1}PMS , contre 800 nanomoles. g^{-1}PMS (1 550 contre 1 000 nanomoles. g^{-1}PMS dans les cultures en fioles.

Il semble donc qu'il y ait une corrélation entre taux en nucléotides adényliques et vitesse de la consommation en sulfates (*via* l'efficacité de la réduction) pour les quatre types de cultures étudiés.

La consommation en ammonium des cellules est toujours plus importante dans les cellules photomixotrophes, surtout en bioréacteur, où elle est plus de deux fois supérieure. Il est aujourd'hui clairement établi (HIREL & GADAL -1980) que la glutamine synthétase, enzyme fondamentale pour l'incorporation de l'ammonium, existe, chez les végétaux supérieurs, sous forme de deux isozymes: chloroplastique (GS_2) et cytoplasmique (GS_1). L'existence d'une étape chloroplastique dans l'incorporation du NH_4^+ pourrait expliquer en partie les prélèvements en ammonium dans le milieu plus importants pour les cellules chlorophylliennes. Le suivi des activités GS dans ces deux types de lignées cellulaires doit nous permettre de vérifier cette hypothèse.

Si l'on compare le tableau des vitesses de croissance à celui donnant les paramètres de croissances des différentes cultures (Tableau n° 8), plusieurs points sont à

souligner:

1) Les deux types de suspensions (hétéro ou mixotrophes), cultivées en fioles, présentent les plus faibles vitesses de consommation en ions minéraux. Par contre, elles présentent un accroissement en biomasse équivalent et souvent même supérieur aux cultures en bioréacteurs. On peut donc penser que le système de culture en fioles d'Erlenmeyer dans un milieu confiné, permet un meilleur rendement de conversion en biomasse des nutriments minéraux que les bioréacteurs aérés.

2) Les lignées cellulaires hétérotrophes présentent le plus souvent des vitesses de prélèvement des nutriments minéraux dans le milieu plus faible que les lignées photomixotrophes, avec une productivité en biomasse toujours supérieure. Les cellules d'*Abrus* hétérotrophes assurent par conséquent une conversion en biomasse des composés minéraux plus efficace

7) Conclusion :

L'étude cinétique de la consommation des principaux nutriments minéraux nous a permis de mettre en évidence le rôle de certains d'entre eux comme d'éventuels facteurs limitants de la croissance : le Pi, le sulfate, l'ammonium dans certains cas...

Pour ces nutriments minéraux faisant l'objet d'une consommation importante, il semble intéressant de réaliser des apports fractionnés au cours de la culture. En ce qui concerne les phosphates, l'équipe du Dr BACCOU, à l'U.S.T.L. Montpellier, a pu montrer une reprise de croissance nette suivant une alimentation en fin de phase de stabilisation de la croissance, dans des suspensions cellulaires hétérotrophes de *Costus speciosus* cultivées en bioréacteur.

Dans l'optique éventuelle d'une exploitation biotechnologique de suspensions cellulaires végétales pour la bioproduction de métabolites secondaires, il est indispensable de maintenir les organismes dans des conditions physiologiques stables, pour lesquelles la production est optimale. Dans ces cultures en chemostat, la nutrition minérale est amenée à jouer un rôle fondamental, puisque des éléments comme le Pi sont alors utilisés comme facteur limitant connu, permettant de stabiliser la croissance à un niveau parfaitement constant. La croissance est alors totalement inféodée à la teneur, maintenue constante par un apport continu, de cet élément limitant.

On a ici affaire à un réacteur biologique *sensu stricto*, où l'étude de la population cellulaire s'effectue grâce à des notions directement issues du génie des réacteurs microbiologiques (bilan énergétiques, flux entrants/sortants, ...)

Au terme de cette étude concernant la nutrition minérale de suspensions cellulaires d'*Abrus precatorius*, des différences de comportement nettes entre suspensions hétérotrophes et mixotrophes d'une part, et cultures en bioréacteur et en fioles d'Erlenmeyer d'autre part ont ainsi pu être visualisées.

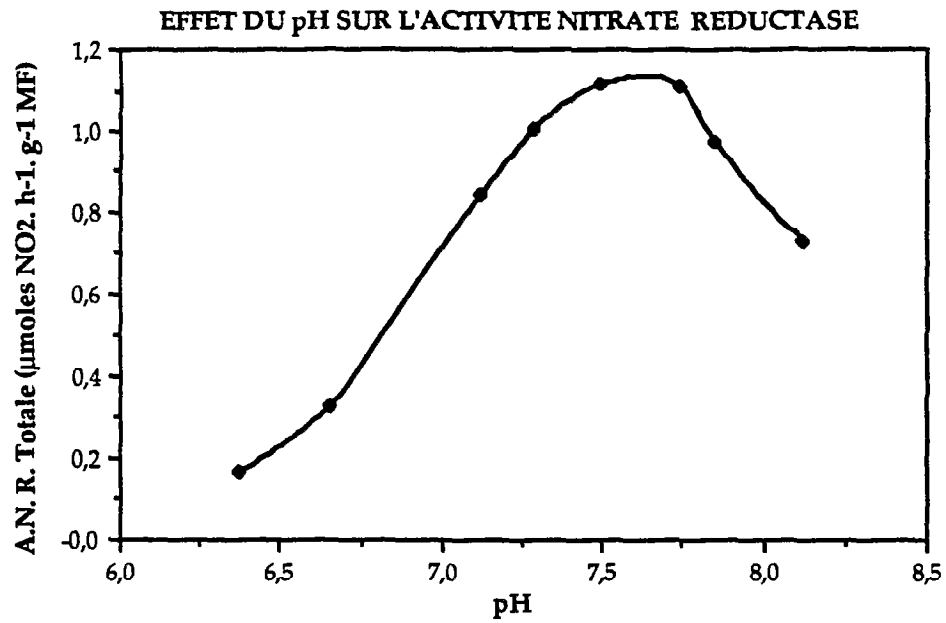
Malheureusement, les données bibliographiques concernant la nutrition minérale d'une même suspension cellulaire placée dans des conditions d'hétéro ou de mixotrophie, ou dans des systèmes de cultures différents, font cruellement défaut.

Dans ce contexte, il est difficile de comparer et discuter nos résultats avec d'autres données acquies sur un matériel différent.

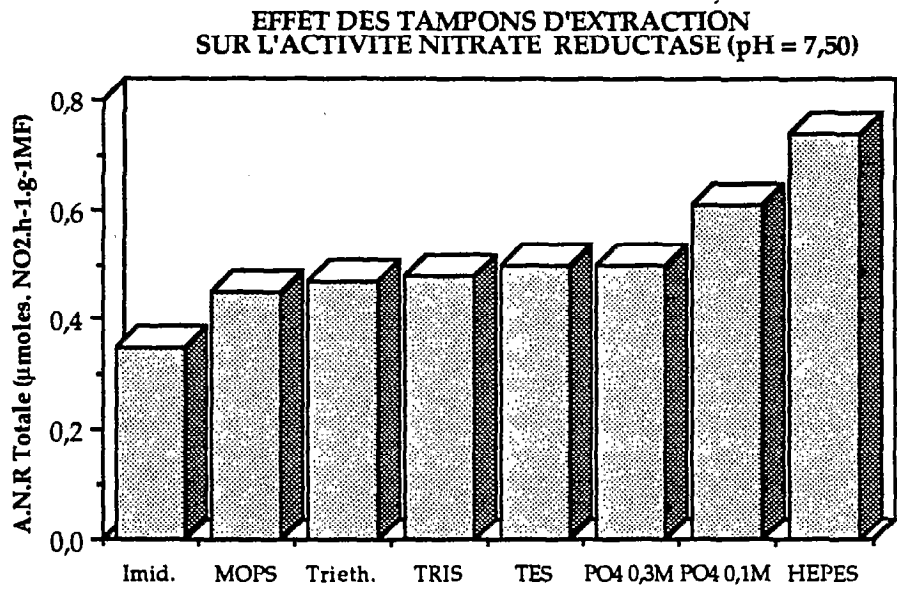
En ce qui concerne la nutrition azotée, l'interprétation de ces différences doit alors s'appuyer sur l'étude des principaux systèmes enzymatiques impliqués dans les étapes primitives de l'incorporation de ces composés.

La caractérisation et l'étude cinétique de l'évolution de ces activités doit permettre d'expliquer certaines de ces différences. Ces travaux font l'objet du chapitre suivant :

(A)



(B)



(C)

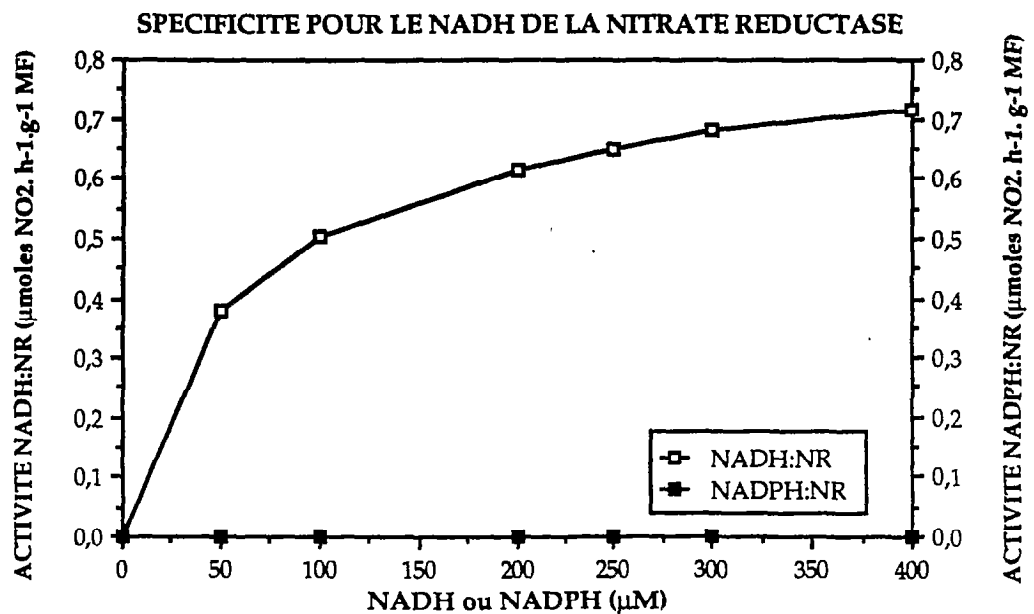


Figure n° 43 : Quelques propriétés de la nitrate réductase extraite de cals chlorophylliens d'*Abrus precatorius*.

D) CARACTERISATION ET EVOLUTION DES ACTIVITES DE QUATRE ENZYMES - CLEFS : NITRATE REDUCTASE, GLUTAMINE SYNTHETASE, RUBISCO & PEP CARBOXYLASE :

1) la nitrate réductase :

Enzyme fondamentale dans l'assimilation des formes oxydées de l'azote, la nitrate réductase des végétaux supérieurs assure la réduction des nitrates en nitrites. Son étude dans les cultures cellulaires doit nous permettre d'étayer les résultats obtenus concernant la nutrition azotée (voir le Chapitre : Données Bibliographiques, § : D-1)

a) Caractérisation partielle de l'enzyme :

Tenant compte des différentes propriétés de la nitrate réductase et des méthodes mises au point par divers auteurs, nous avons cherché à adapter, chez *Abrus precatorius*, une technique optimale d'extraction et de dosage.

Ces expérimentations ont été conduites sur des extraits enzymatiques bruts. Nous avons utilisé, pour la caractérisation partielle de la nitrate réductase et de la glutamine synthétase, des cals photomixotrophes d'*Abrus precatorius* (lignées 2T & 6H) âgés de 12 à 16 jours. Ce souchier statique de cals chlorophylliens nous a permis de disposer d'un matériel végétal homogène et abondant, sans avoir à utiliser notre souchier cellulaire, toujours plus difficile à maintenir.

L'action des divers effecteurs est testée en ajoutant ces composés lors de l'extraction, pour les agents protecteurs (protéines, thiols, complexants, flavines), ou de l'incubation pour les composés tels que cations divalents et ammonium.

Nota : Les graphiques ont été réalisés à partir des valeurs moyennes de trois incubations différentes

1) Effet du pH : (figure n° 43 A)

Mesurée sur une gamme de pH allant de 6,4 à 8,2 dans du tampon d'extraction K-Phosphate 100 mM, l'activité nitrate réductase montre un maximum d'activité à pH = 7,5.

L'activité NR subit une très forte inhibition aux pH acides : on divise l'activité NR totale d'un facteur 6 en passant d'un pH 7,5 à 6,5.

Ce résultat est conforme à la majorité des données bibliographiques disponibles, donnant pour la NR un pH optimal de 7,0 à 7,5. (voir notamment la revue bibliographique de HAGEMAN & HUCKLESBY - 1971)

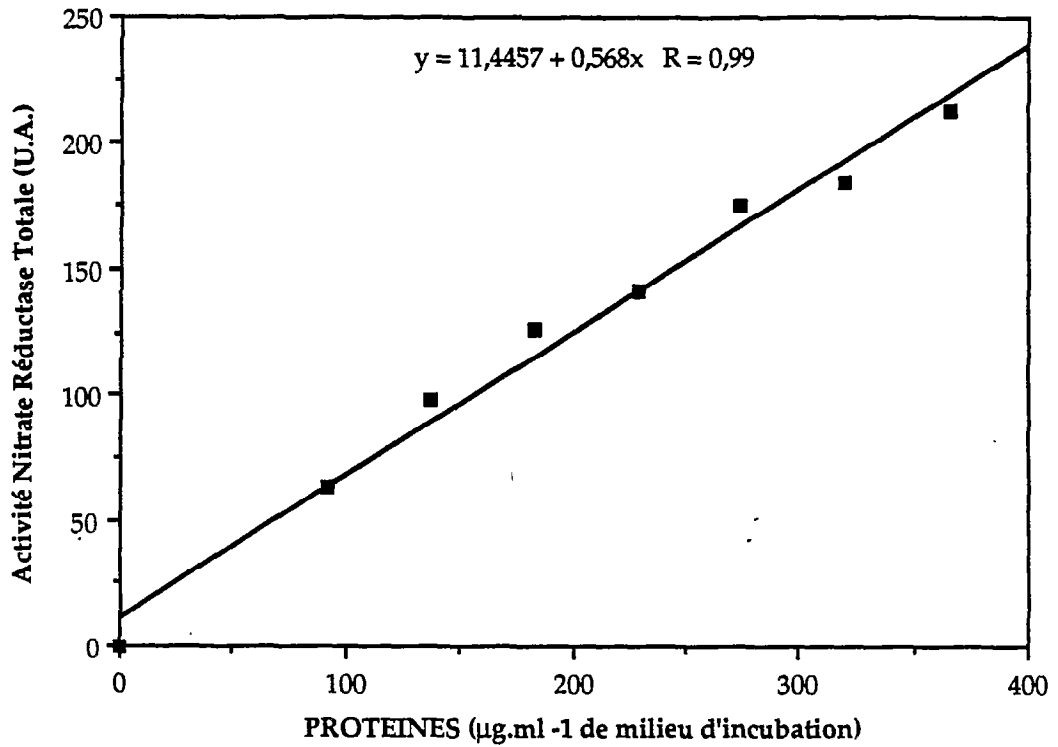
2) Effet de la nature du tampon d'extraction : (figure n° 43 B)

Après avoir déterminé le pH d'extraction optimal pour la NR, nous avons extrait le même échantillon avec 8 tampons différents à pH = 7,50 : Triéthanolamine (100 mM) ; TES (100 mM) ; MOPS (100 mM) ; Imidazole (100 mM) ; HEPES (100 mM) ; Tris-HCl (100 mM) ; K-Phosphate (100 mM) ; K-Phosphate (300 mM).

A la lecture de la figure 43-B, il apparaît que les extraits réalisés avec les tampons HEPES, Tris et Phosphate 100 & 300 mM sont les plus actifs, alors que l'imidazole montre un effet légèrement inhibiteur.

SAUVESTY *et al* (1986) décrivent un effet positif très net ($\times 5,5$) du tampon HEPES (Ph = 7,4) dans l'extraction de la NR par rapport au Tris-HCl (Ph = 8,5). Cependant, compte tenu de la sensibilité de la nitrate réductase aux variations de pH,

EFFET DE LA CHARGE EN PROTEINES SUR L'ACTIVITE NR



INFLUENCE DE LA DUREE D'INCUBATION

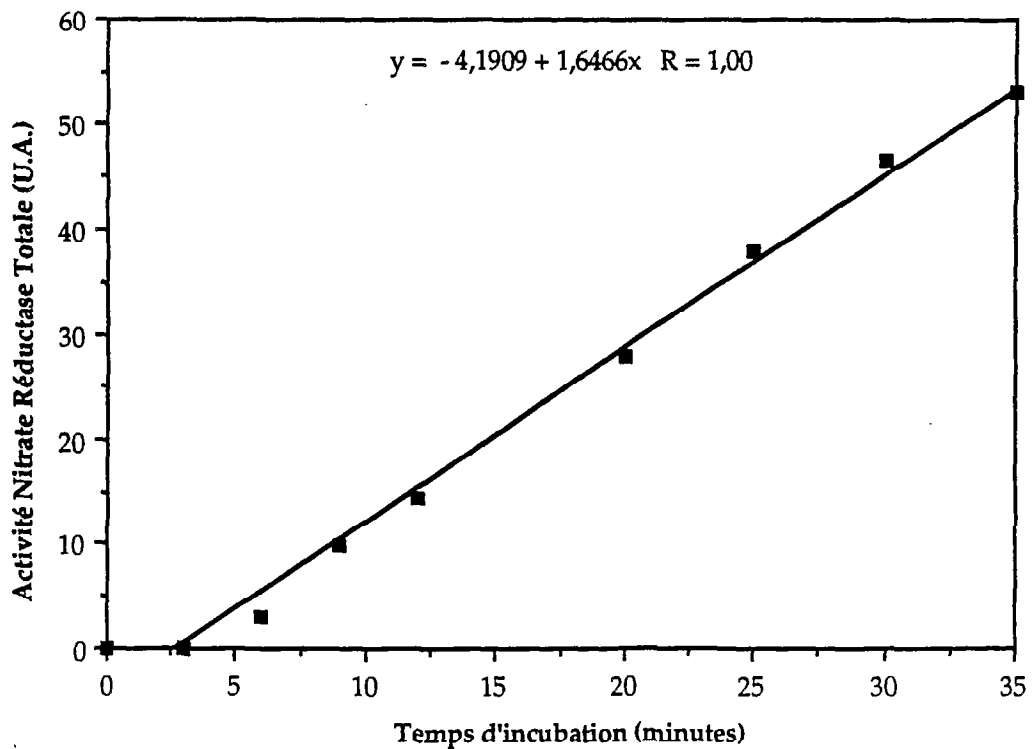


Figure n° 44 : Influence de la durée d'incubation et de la charge en protéines sur la mesure de l'activité nitrate réductase

cette différence importante d'ANR peut être attribuée pour partie à la différence de pH entre les deux tampons.

Nos résultats confirment ceux décrits dans la bibliographie, où Tris-HCl et Phosphate apparaissent comme les tampons d'extraction les plus utilisés pour la mesure de l'activité nitrate réductase. (HAGEMAN & HUCKLESBY - 1971)

De plus, KUO *et al* (1982-b) notent une meilleure stabilité de l'enzyme dans le tampon Tris, par rapport au K-Phosphate.

Les dosages de Pi interne nécessaires à la suite de notre étude étant réalisés dans les extraits enzymatiques bruts, il nous est impossible d'utiliser un tampon Phosphate.

Nous avons donc opté pour un tampon Tris-HCl (100 mM) pH = 7,5, aisément disponible et déjà utilisé au Laboratoire pour le dosage de nombreux systèmes enzymatiques.

3) Spécificité pour le donneur d'électrons : (Figure n° 43 C)

Il apparaît nettement que la nitrate réductase extraite d'*Abrus precatorius* utilise spécifiquement le NADH comme donneur d'électrons. Aucune activité NR n'est mesurable pour des concentrations en NADPH allant jusqu'à 400 μ M.

La courbe d'évolution de l'activité en fonction de la concentration en NADH montre un comportement cinétique de type Michaelien, présentant un ralentissement net à partir de 100 μ M en substrat.

La Figure n° 47 met en évidence une inhibition de l'enzyme par excès de substrat pour des taux en NADH supérieurs à 400 μ M. Ce résultat confirme bien le rôle régulateur du taux en NADH intracellulaire sur l'activité NR.

Si la majorité des plantes étudiées présente une activité NADH : NR (EC 1.6.6.1), une enzyme bispécifique NAD(P)H : NR (EC 1.6.6.2) a pu être mise en évidence chez plusieurs espèces : (EVANS & NASON-1983 ; SCHRADER *et al.* - 1968 ; HAGEMAN & HUCKLESBY - 1971).

JOLLY (1975) et ses collaborateurs ont pu séparer les deux formes de NR à partir du même matériel végétal (feuilles de soja), infirmant ainsi l'hypothèse avancée par DAILEY *et al.* (1982) d'une phosphatase responsable de la conversion du NADPH en NADH. Cette phosphatase était supposée assurer l'alimentation en NADH d'une forme unique de NR (NADH-NR).

La NAD(P)H : NR montre le plus souvent des caractéristiques biochimiques originales : cette enzyme, bispécifique NADH/NADPH, présente un Km beaucoup plus élevé (10 à 50 fois) pour le nitrate que la NADH : NR, une masse moléculaire plus faible, et des caractéristiques immunologiques différentes. (CAMPBELL & SMARELLI-1986)

4) Conditions de linéarité de la mesure d'activité : (Fig.: 44)

Dans nos conditions de mesure (voir le Chapitre Matériel & Méthodes § D), l'évolution de l'activité nitrate réductase est linéaire jusqu'à 35 minutes pour une quantité maximale en protéines solubles de 400 μ g.ml⁻¹ de milieu d'incubation.

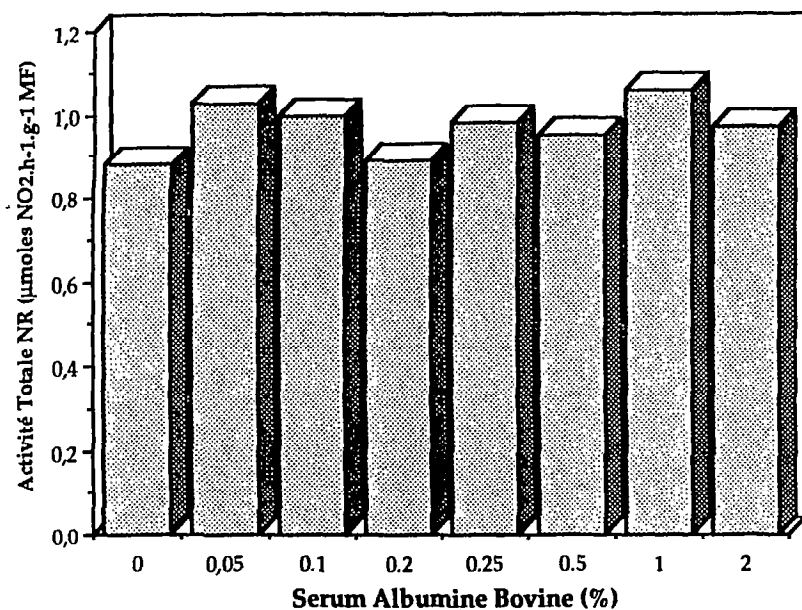
5) Effet des protéines exogènes : (Figure n° 45)

L'instabilité de la nitrate réductase lors de son extraction et de sa conservation est une propriété abondamment décrite (voir la revue bibliographique de HAGEMAN & HUCKLESBY -1971, et le Chapitre Données Bibliographiques de la présente étude, § D-1 b)

Afin de limiter l'éventuelle dégradation de la NR par les protéases libérées au cours de l'extraction, nous avons testé l'effet de deux protéines exogènes : la Sérum Albumine Bovine (SAB) et la caséine.

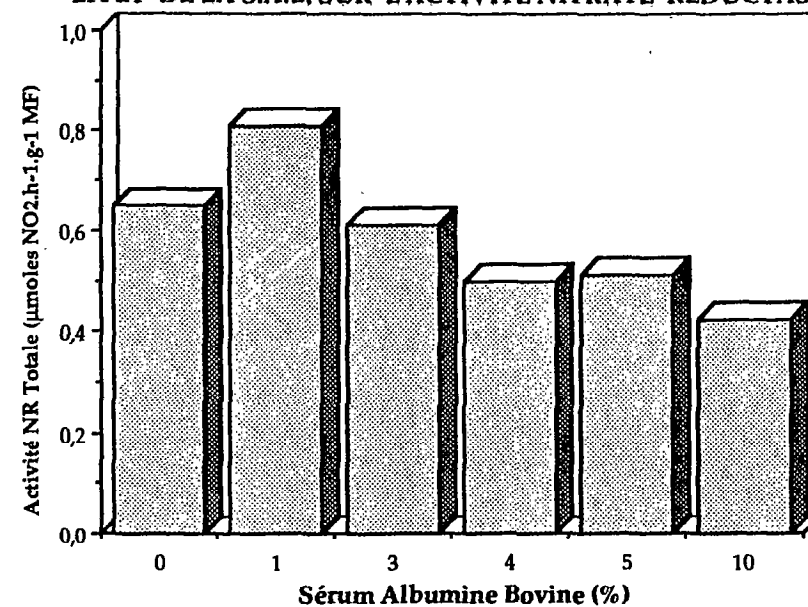
A

EFFET DE LA S.A.B. SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE



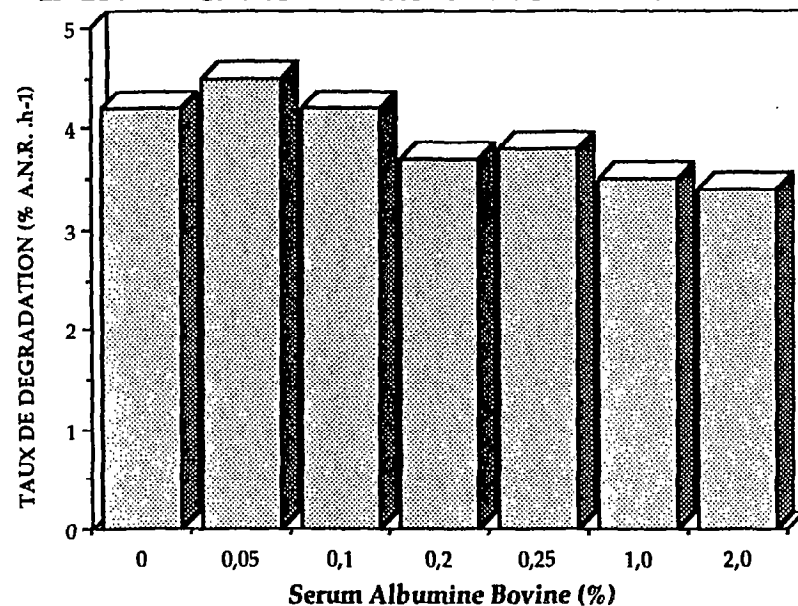
B

EFFET DE LA S.A.B. SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE



C

EFFET DE LA S.A.B. SUR LE TAUX DE DEGRADATION DE LA N.R.



D

EFFET DE LA S.A.B. SUR LA CONSERVATION DE L'A.N.R.

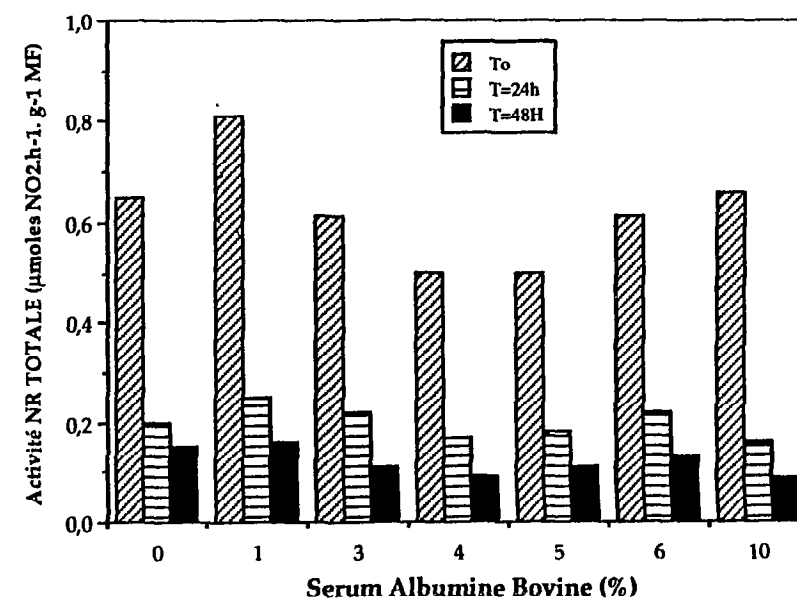


Figure n° 45 : Influence de la SAB sur l'extraction et la conservation de la nitrate réductase

En effet, SCHRADER *et al* (1974), après avoir testé diverses protéines (peptone, gélatine, hémoglobine, SAB & caséine) montrent que ces deux derniers polypeptides sont les plus efficaces pour la protection et la conservation de la nitrate réductase extraite de feuilles de maïs et d'avoine.

La Serum Albumine Bovine a été utilisée suivant deux gammes de concentrations: de 0 à 2 %, puis de 0 à 10 % (w./v.). Cette protéine n'induit aucune modification nettement mesurable sur l'activité nitrate réductase jusqu'à 2 % ; elle semble plutôt inhibitrice aux concentrations supérieures (Fig. n° 45 -A & B).

Nous avons ensuite étudié l'action de la S.A.B. sur la conservation de l'activité NR à 4°C. Le taux de dégradation de la nitrate réductase est estimé, suivant KUO *et al.* (1982) en % d'activité disparue par heure. Calculé pour 48 heures de stockage à 4°C, ce taux de dégradation ne subit pas de modification notable si on utilise une concentration en SAB de 0 à 2 %; il reste voisin de 4 % ANR disparue.h⁻¹. (Fig. n° 45-C)

Sur une gamme de SAB de 0 à 10 %, il est impossible de mettre clairement en évidence un effet de la protéine sur la conservation (Fig. n° 45-D). Il est intéressant de remarquer qu'au temps T₀ (extraction de l'enzyme), la courbe donnant l'activité en fonction de la concentration en SAB ne montre pas la même allure que lors de la précédente étude, excepté un léger effet positif pour 1%. L'action de la SAB au moment de l'extraction de la nitrate réductase est donc, pour notre matériel végétal, de faible amplitude et variable suivant les échantillons. On note, en outre, une perte d'activité très importante dès les premières 24 heures de conservation à 4°C.

SCHRADER *et al* (1974) montrent que l'addition de SAB à 3% dans le tampon d'extraction permet d'améliorer remarquablement (jusqu'à 15 fois) l'activité NR foliaire de plusieurs plantes supérieures (Tabac, Maïs, Avoine). En outre, sur ce matériel, la SAB limite efficacement la dégradation de la NR dans les extraits au cours de sa conservation.

Testée de 0 à 5 % dans le tampon d'extraction, la caséine ne montre aucun effet protecteur sur la nitrate réductase (résultats non illustrés), elle apparaît même légèrement inhibitrice aux fortes concentrations (4-5 %).

Pour JORDAN & FLETCHER (1980), l'effet de la caséine sur l'ANR est extrêmement variable en fonction de l'âge des cellules de *Rosa* étudiées. Ces auteurs rajoutent au tampon d'extraction de la caséine à 1%. Ils notent que, sur une suspension âgée de 4 jours, l'amélioration apportée par l'ajout de cette protéine est de 100 %, alors que l'ANR est augmentée de 400 % sur des cellules de 9 jours.

ROBIN (1979) met en évidence un effet protecteur de la caséine sur la NR de feuilles et de racines de Maïs. L'activité est multipliée par trois dans les feuilles en présence de 1,5% de caséine ; la nitrate réductase n'est décelable dans les feuilles que si l'extraction est effectuée avec de la caséine.

Sur des germinations d'orge, KUO *et al.* (1982) montrent une action protectrice de la caséine sur la nitrate réductase. Ces auteurs attribuent à la caséine un effet inhibiteur sur les protéases acides, mais aussi un rôle d'absorbant des polyphénols.

Afin de protéger la nitrate réductase extraite de notre matériel végétal, nous avons employé un antiprotéase de synthèse : le Phényl- methyl sulfonyl fluorure (PMSF), à la concentration de 10 µM. Cet inhibiteur est spécifique des protéases à sérine, est aujourd'hui couramment employé de préférence à l'adjonction de protéines dans les tampons d'extraction. (SCHRADER *et al.* - 1974; SCOPES -1987). Nous avons utilisé le PMSF plutôt par sécurité, car sur notre matériel végétal *in vitro*, aucune action protéasique n'a pu être clairement mise en évidence.

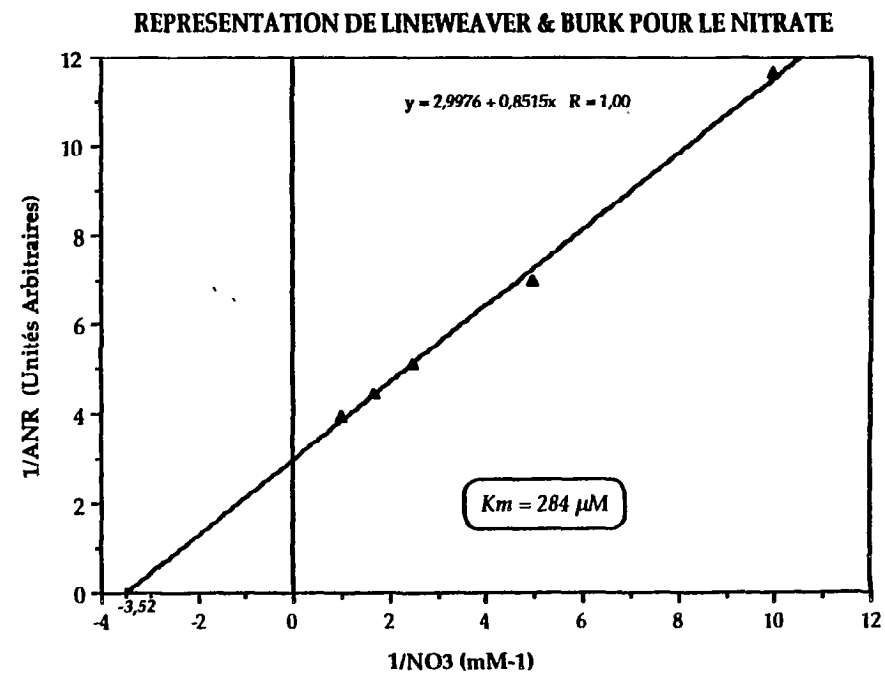
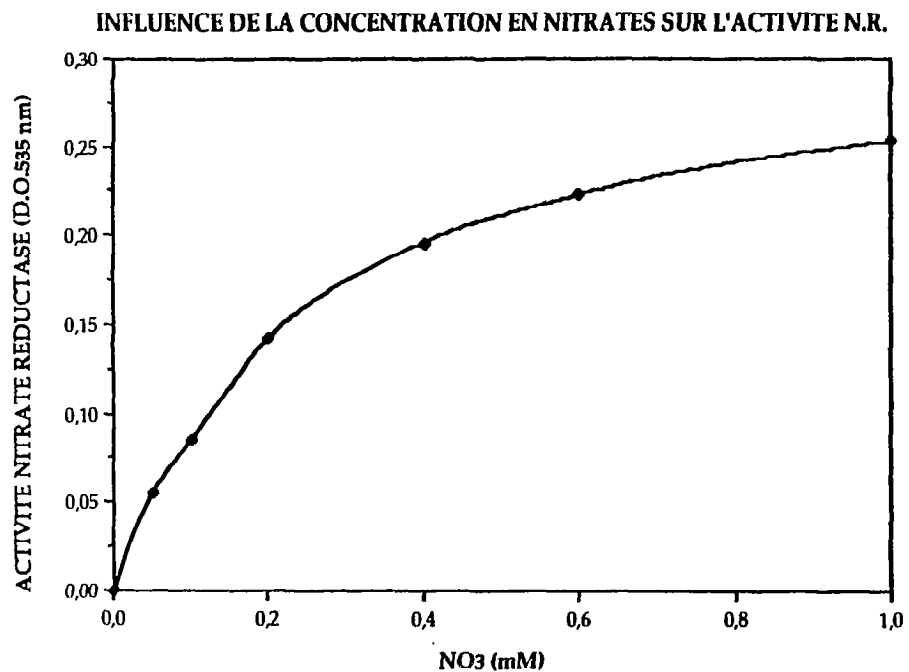
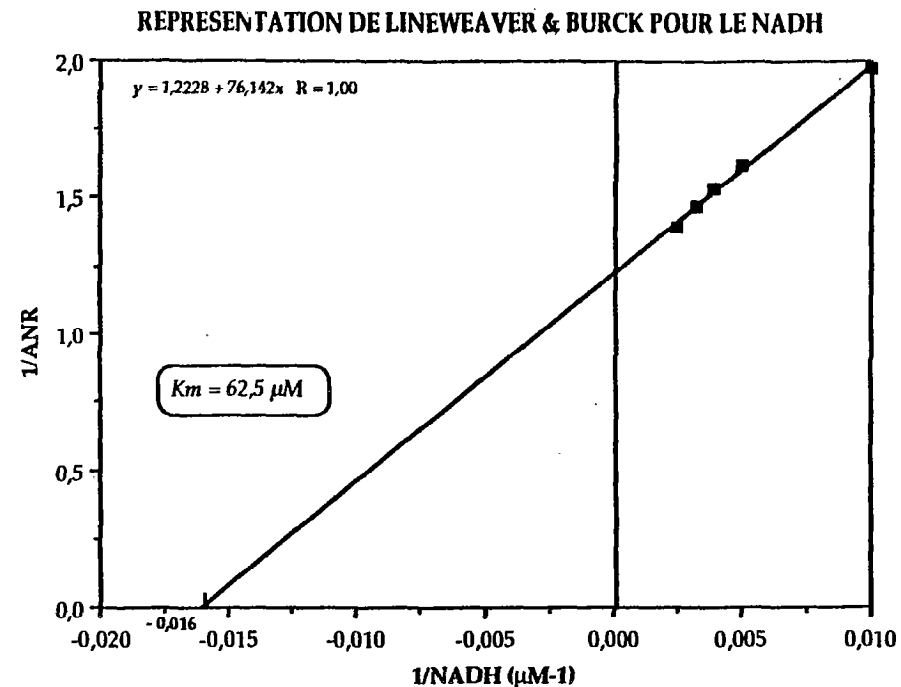
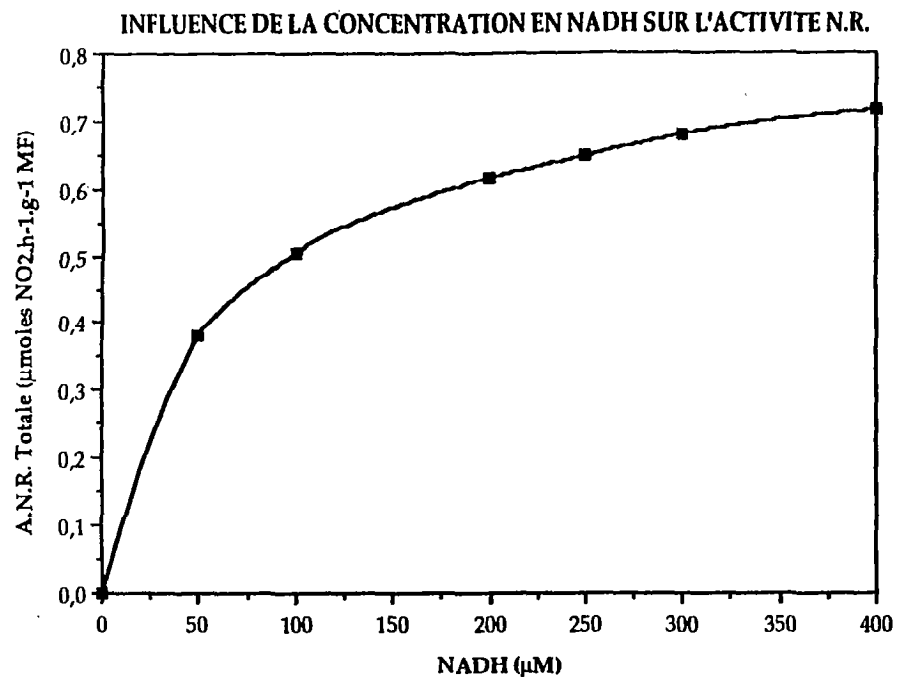


Figure n° 46 : Mesure des constantes d'affinité de la nitrate réductase pour le nitrate et le NADH.

5) Mesure des constantes de Michaelis-Menten pour le nitrate et le NADH : (Figure n° 46)

- Km pour le nitrate : (Figure n° 46 - C&D)

La mesure des constantes cinétiques pour le nitrate s'est avérée impossible sans un dessalage préalable de l'extrait brut. La teneur importante en nitrates internes des cals semble être responsable de ce phénomène : en effet, un apport de nitrates exogènes, jusqu'à une concentration de 20 mM, ne provoque aucune modification de l'activité.

Afin d'éliminer les nitrates intracellulaires de l'extrait enzymatique brut, deux techniques différentes ont été employées (voir le chapitre Matériel & Méthodes; § D-1-b-1). Il s'agit de:

- une ultrafiltration sur membrane
- une ultracentrifugation sur gradient de saccharose après précipitation fractionnée au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 20-40 % (HOARAU *et al.* 1986)

La technique de dessalage par ultrafiltration a fourni des résultats peu satisfaisants.

Les opérations de concentration/lavage par le tampon (répétées 2 fois afin d'éliminer totalement le nitrate résiduel) sont longues (plus de 5 heures) et conduisent à une perte importante de l'activité (50 %). Cette chute peut s'expliquer soit par une adsorption d'une partie des protéines sur la membrane d'ultrafiltration, soit par une dégradation de la NR au cours du dessalage (protéolyse oxydation...). On décèle dans ce cas une activité NR, même sans ajout de nitrates exogènes : le dessalage semble incomplet, mais un lavage plus poussé de l'extrait conduirait à une perte d'activité trop importante. Une autre technique de dessalage doit être employée.

Grâce à une prépurification plus complète de l'extrait brut (précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium 20-40 %, puis ultracentrifugation sur gradient de saccharose) nous avons pu déterminer plus précisément les constantes de Michaelis de l'enzyme pour le nitrate.

Une première expérimentation, utilisant des concentrations en nitrates de 0 à 50 mM, nous a permis de mettre en évidence une inhibition par excès de substrat à partir de 5 mM en NO_3 . (Figure n° 47)

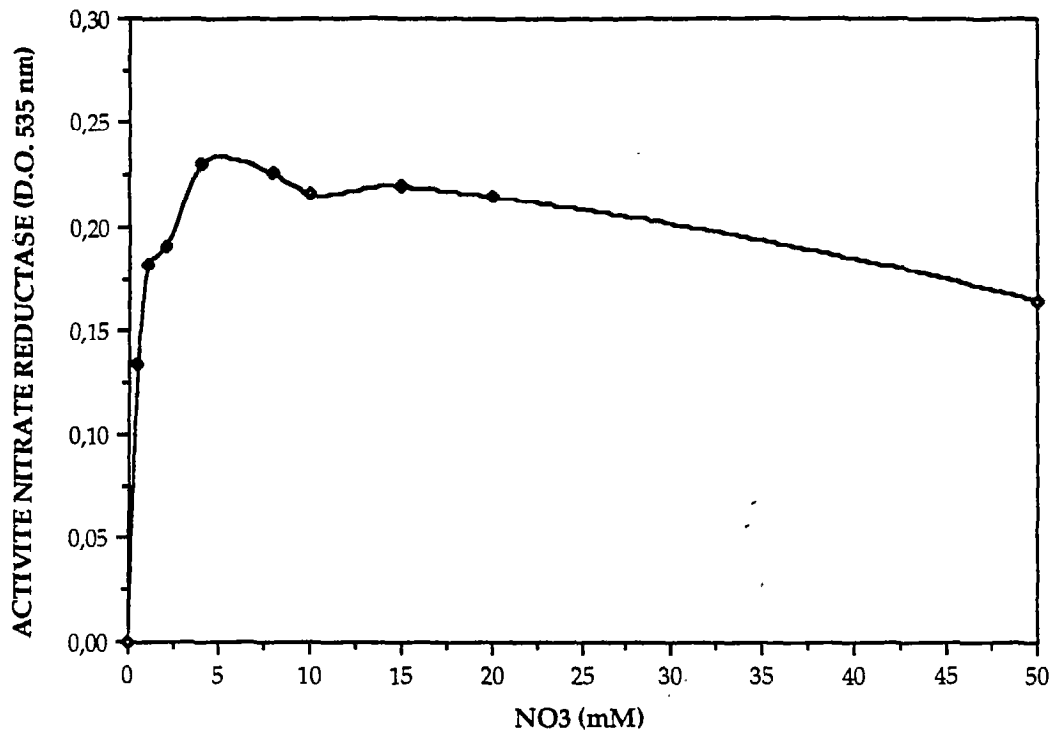
A la suite d'un deuxième essai (NO_3 de 0 à 1 mM), le tracé en représentation de Lineweaver & Burk nous a permis d'estimer la constante d'affinité apparente (K_m) de l'enzyme pour le nitrate : elle est de l'ordre de 300 μM (284 μM), pour une concentration en NADH de 900 μM .

Après dessalage par ultrafiltration, le K_m mesuré était de 730 μM environ. Il convient de considérer ce résultat avec prudence : cette mesure a été réalisée sur une enzyme probablement altérée par une longue opération de dessalage.

Vu le nombre restreint de travaux concernant la caractérisation de la NR dans les suspensions cellulaires *in vitro*, et la très grande variabilité des valeurs des constantes d'affinité suivant le matériel végétal, il est difficile de pouvoir confronter nos résultats. (voir le tableau bibliographique récapitulatif)

OJI *et al* (1985) mesurent, pour la NADH : NR extraite feuilles d'Orge, un K_m pour le nitrate de 270 μM , alors que REDINBAUGH & CAMPBELL (1983) l'estiment à 40 μM dans les cotyledons de *Cucurbita maxima*.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NITRATES . (NR PURIFIEE)



INHIBITION DE L'ACTIVITE NR PAR EXCES DE NADH

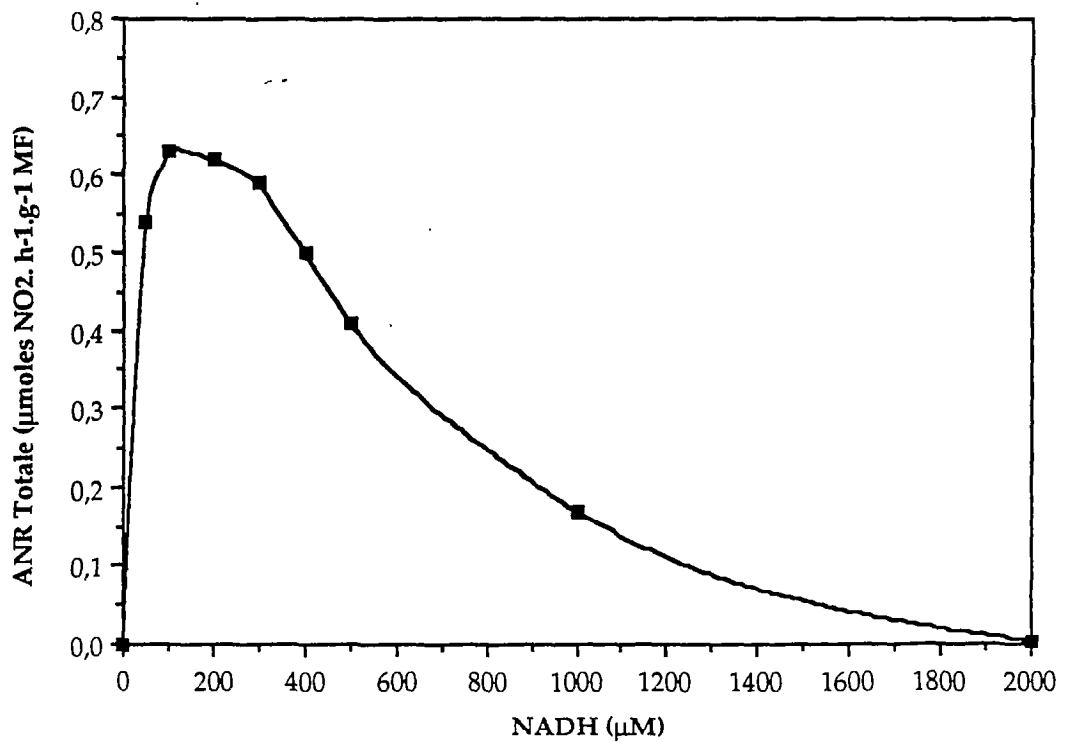


Figure n° 47 : Influence des fortes concentrations en substrat sur l'activité nitrate réductase

- Km et Vmax pour le NADH : (Figure n° 46 - A&B)

En ce qui concerne le NADH, les quatre mesures de constantes d'activité effectuées ont donné des valeurs pour le Km variant de 60 à 110 μM , en fonction de l'âge et de l'état physiologique du matériel végétal utilisé, pour une concentration en NO_3 de 1,1 mM.

Les courbes présentées sur la figure n° 46 (A&B) ont permis de calculer un Km d'environ 60 μM , avec une saturation de l'enzyme par son substrat visible à partir de 500 μM en NADH.

Sur un extrait brut provenant d'un échantillon différent, nous avons pu mettre très clairement en évidence une inhibition de l'enzyme par excès de substrat, pour les concentrations en NADH supérieures à 200 μM . La NR est alors saturée pour des concentrations en NADH de l'ordre de 100 μM . (Fig. n° 47)

Les vitesses maximales de réaction pour le NADH varient de 0,8 à 1,5 $\mu\text{moles NO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$.

Les résultats obtenus apparaissent du même ordre que ceux présentés par différentes équipes travaillant sur la NR extraite de suspensions cellulaires végétales. Ainsi, MENDEL *et al.* (1980) mesurent un Km de 50 μM pour le NADH dans des suspensions cellulaires de Tabac. Cette même constante d'affinité atteint 147 μM dans une culture cellulaire de riz. (YAMAYA & OHIRA - 1977).

6) Effet des cations divalents: Calcium & Magnesium : (Fig. n° 48 -C)

Les ions Mg^{2+} présentent un effet légèrement inhibiteur sur l'activité nitrate réductase. L'inhibition apparaît de plus en plus marquée pour les concentrations en magnésium de 0 à 1 mM, puis reste stable de 1 à 5 mM (30 % d'inhibition environ). On se place ici dans une gamme de concentrations compatible avec la physiologie de la cellule végétale.

L'inhibition par le calcium est nettement plus importante : Elle peut atteindre plus de 80 % de l'activité témoin pour 5 mM de Ca^{2+} libre (concentration non physiologique).

La composition ionique des extraits bruts doit être prise en compte. Il est en effet possible que l'adjonction de magnésium exogène lors de l'étude d'un éventuel effet Mg soit sans effet, à cause de la présence déjà importante de Magnesium dans l'extrait. Cet élément est fourni à la concentration de 1,5 mM par le milieu de Murashige & Skoog et pourrait être concentré par les cellules.

Il peut être également judicieux d'impliquer les anions d'accompagnements utilisés lors de ces expérimentations. Nous avons utilisé des sels de sulfate de magnésium et de calcium, évitant ainsi l'effet inhibiteur des ions chlorure.

7) Effet des complexants : EGTA & EDTA : (Fig. n° 48-A & B)

L'EGTA ne présente aucun effet significatif sur l'activité nitrate réductase jusqu'à une concentration de 10 mM dans le milieu d'incubation. Les extraits bruts renferment donc peu de Ca^{2+} libre.

Par contre, l'adjonction d'EDTA permet, à partir de 1 mM, d'augmenter très nettement l'activité NR. Le Magnesium se trouve donc dans les extraits bruts à une concentration suffisante pour exercer une inhibition sur la NR. L'accroissement d'activité représente, pour 1 mM en EDTA, plus de 250% par rapport au témoin.

L'EDTA est employé dans la majorité des tampons décrits dans la littérature pour l'extraction de la NR. (ASLAM *et al.* -1976)

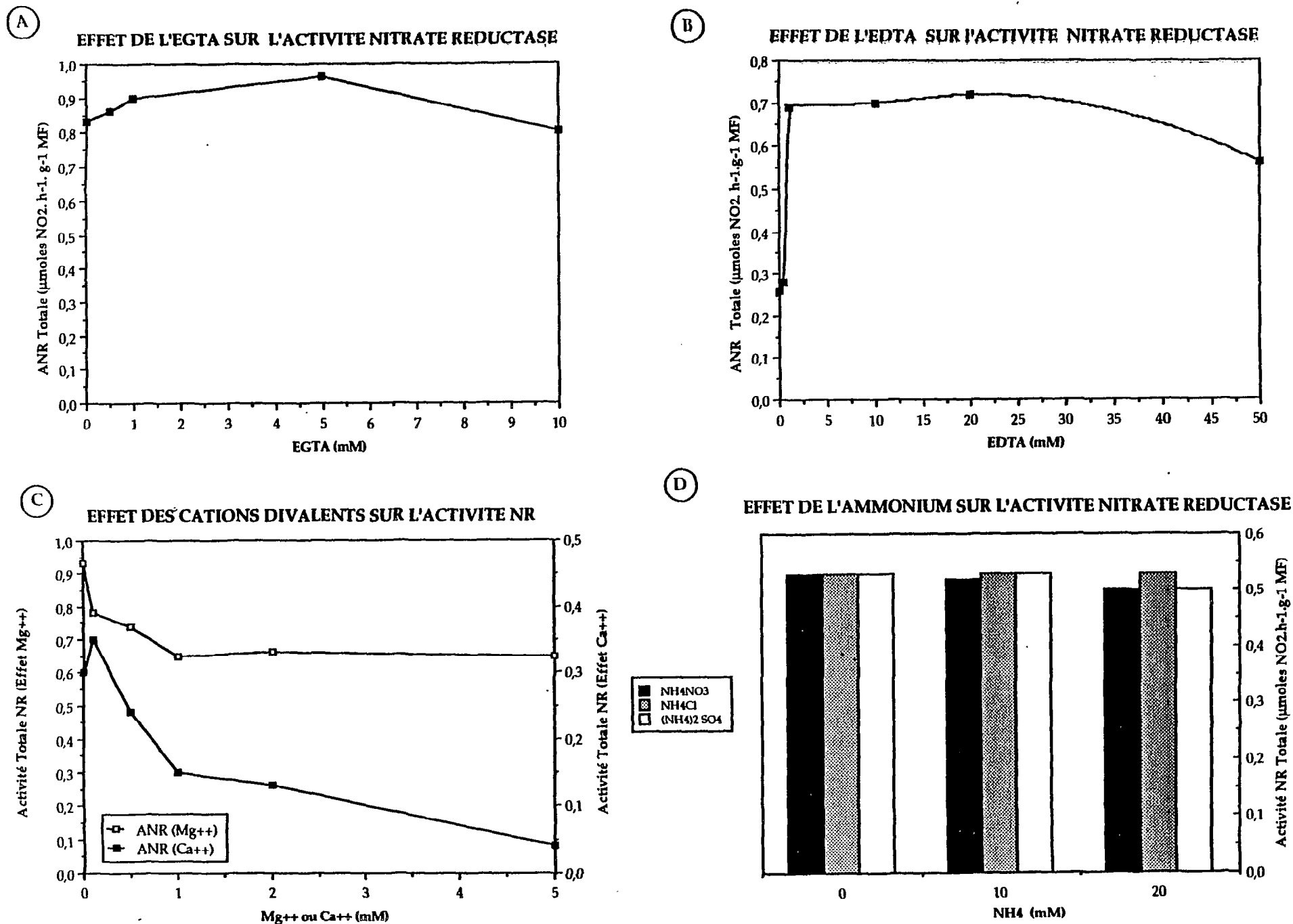


Figure n° 48 : Influence de divers effecteurs sur l'activité nitrate réductase.

Nos résultats semblent confirmer la sensibilité de la N.R. à l'action des cations divalents. Ils semblent néanmoins en désaccord avec les propriétés affichées pour ces deux complexants : l'EDTA, très efficace sur la NR, possède une meilleure affinité pour le magnésium que pour le calcium (inverse pour l'EGTA)

8) Effet de l'ammonium : (Figure n° : 48-D)

Nous avons recherché un effet éventuel de l'ammonium (à 10 & 20 mM dans le milieu d'incubation) sur l'activité nitrate réductase.

Afin de nous affranchir de l'effet de certains anions d'accompagnement (le chlore, notamment), l'expérimentation a été conduite à l'aide de différents sels d'ammonium: nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), chlorure d'ammonium (NH_4Cl), et sulfate d'ammonium ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Aucun effet n'a pu être mis en évidence, quel que soit le sel utilisé, ou la concentration en NH_4^+ .

Il importe de préciser que la concentration en ammonium dans l'extrait brut est, au départ, de 8 mM environ. Le NH_4 exogène est le seul pris en compte dans cet essai ; il est donc possible que nous nous soyons placés au-delà du seuil d'influence éventuelle de l'ammonium, en rajoutant 10 puis 20 mM à un extrait déjà riche en cet ion.

RAMBOUR *et al.* (1983) montrent que l'ajout d'ammonium à 5 mM lors de l'incubation *in vitro* de la NR extraite de cultures cellulaires de *Silene alba* ne modifie pas le niveau d'activité.

De nombreux auteurs se sont intéressés, sur des cultures cellulaires végétales, à l'effet de l'ajout de NH_4^+ dans les milieux de culture sur l'activité nitrate réductase.

Pour RAMBOUR *et al.* (1983) l'ammonium inhibe l'activité nitrate réductase *in vivo*, mais ne modifie pas la réaction *in vitro*. D'après ces auteurs, le NH_4^+ agirait vraisemblablement en modifiant l'utilisation du NADH intracellulaire. L'entrée dans le cytosol des ions ammonium pourrait en effet déclencher ou activer la glutamate déshydrogénase (GDH) ou la glutamate (amide)-2-oxoglutarate amino transférase (GOGAT). La baisse de l'activité NR *in vivo* résulterait alors d'une compétition entre divers systèmes enzymatiques pour le NADH. Ce phénomène ne pourrait être mis en évidence lors de mesures d'activité *in vitro*, où le NADH est apporté en concentrations non limitantes.

Différents auteurs ont, à l'inverse, remarqué une augmentation de l'ANR en présence d'ammonium (revue bibliographique de CAMPBELL & SMARELLI - 1986).

Le NH_4 n'aurait pas un rôle d'"inducteur spécifique" de la nitrate réductase, car l'augmentation de l'activité alors mesurée doit plutôt être associée à une activation généralisée du métabolisme azoté, conduisant à une synthèse protéique intense. Une telle activation peut être tout aussi bien réalisée par des facteurs très différents : phytohormones, irradiation γ , etc...

9) Effet des nucléotides : FMN, NAD, FAD et du Molybdène : (Résultats non illustrés)

Trois nucléotides (FMN, FAD & NAD) et un cation métallique (Molybdène) ont été rajoutés au tampon d'incubation à la concentration de 10 μM . Seul le FAD semble avoir une légère action positive sur l'activité nitrate réductase. Les autres nucléotides testés sont sans effet. Le Molybdène, à 10 μM , est faiblement inhibiteur: les concentrations internes en Mo pourraient être suboptimales, car cet élément est déjà apporté (à 1 μM) par le milieu de culture.

Nos résultats sont cependant en accord avec les données de KUO *et al.* (1982), qui notent un effet plus marqué du FAD par rapport au Molybdène sur la protection de

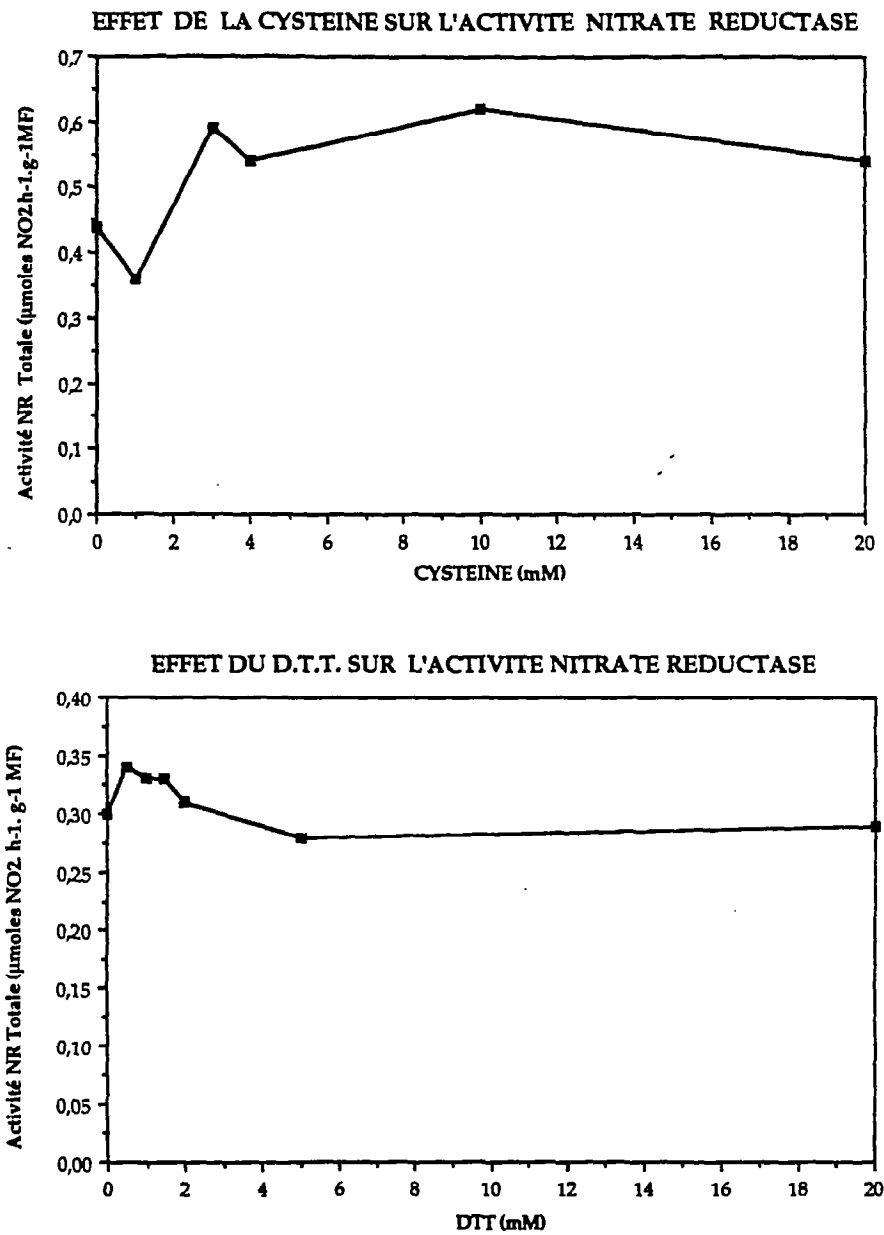


Figure n° 49 : Influence de deux antioxydants à thiols sur l'activité nitrate réductase.

l'enzyme. Pour ces auteurs, flavines et Molybdène maintiendraient la structure quaternaire active de la protéine en agissant directement sur le groupement prosthétique MoCo. (voir le Chapitre : Données bibliographiques § D-1)

10) Effet des composés antioxydants à thiols : (DTT & cystéine)

(Figure n° 49)

• Le Dithiothréitol, utilisé aux concentrations voisines de 1mM, présente un faible effet positif (+15 %) sur l'activité nitrate réductase. Aux concentrations supérieures (2 à 20 mM), aucune action de ce composé n'est décelée. (Figure n° 49-B)

• La cystéine apporte une augmentation notable de l'activité si elle est utilisée à des concentrations supérieures à 3mM (3 à 20 mM). Elle provoque alors une augmentation de l'ANR d'environ 35%. (Figure n° 49-A)

Ce résultat est en accord avec les données de différents auteurs, travaillant sur des matériels végétaux différents (voir la revue bibliographique de HAGEMAN & HUCKLESBY -1971).

Plusieurs auteurs (WRAY & FILNER - 1970 ; KUO *et al.* - 1982) montrent que la fonction catalytique de la NR nécessite la présence de groupements sulfhydryl (S-H) fonctionnels; ainsi, la présence d'agents réducteurs exogènes dans le tampon d'extraction permettrait de limiter l'oxydation *in vitro* de l'enzyme.

Nota : Sur des extraits de cals et de cellules isolées d'Abrus precatorius, aucun brunissement à l'air n'est perceptible. Nous n'avons pas utilisé systématiquement de composés absorbant des polyphénols (PVP).

b) Evolution de l'activité nitrate réductase dans des cultures hétéro et mixotrophes en fioles et en bioréacteur :

1) Evolution de l'activité nitrate réductase : (Fig. n° 50)

Dans les quatre types de culture étudiés, l'évolution de l'activité nitrate réductase spécifique suit le même schéma. L'ANR est nulle lors de l'ensemencement de la suspension, puis l'activité augmente brutalement dès le premier jour de culture, pour atteindre un maximum au 4^e jour. L'activité nitrate réductase décroît ensuite et n'est plus détectable en fin de culture. La chute d'activité est plus rapide pour les suspensions hétérotrophes, où l'ANR a totalement disparu au jour 8, alors que dans les suspensions photomixotrophes, l'ANR se maintient jusqu'au onzième jour de culture.

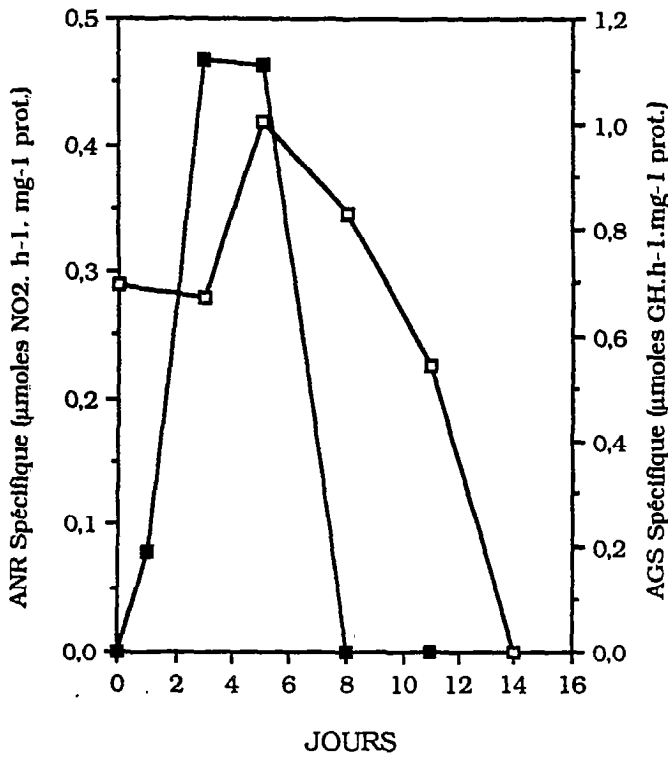
Il est important de remarquer que l'activité NR est beaucoup plus élevée dans les cellules mixotrophes, quel que soit le système de culture employé (fioles ou réacteur agité et aéré). Dans les cultures cellulaires en fioles d'Erlenmeyer, la NR est deux fois plus active pour les cultures mixotrophes que pour les hétérotrophes ; elle est trois fois plus active pour les mêmes cellules en bioréacteur.

Les valeurs d'activité NR obtenues sont légèrement inférieures à celles obtenues par POULLE et RAMBOUR (1979) sur des cellules hétérotrophes de *Silene alba*. Les activités rencontrées restent cependant du même ordre : de 2 à 3 micromoles de NO₂ fixées par heure et par gramme de biomasse fraîche.

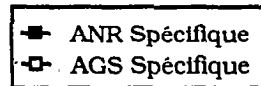
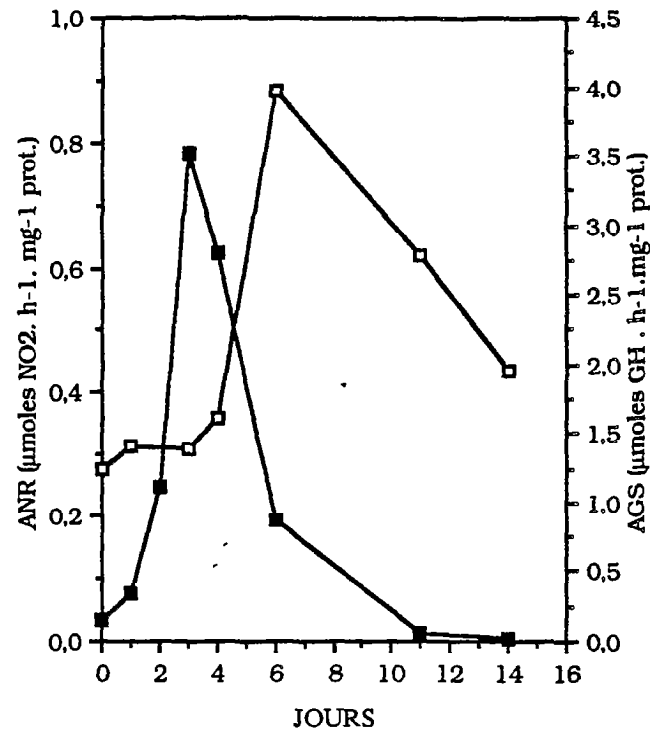
L'apparition très rapide d'une activité nitrate réductase dans des cellules végétales cultivées *in vitro* sur un milieu contenant des nitrates ou un mélange nitrate/ammonium a été rapportée par de nombreux auteurs (Voir la récente revue bibliographique de CAMPBELL & SMARELLI - 1986)

OAKS (1974) montre, sur des cultures cellulaires de soja, qu'une activité NR apparaît trois heures seulement après le transfert dans un milieu neuf.

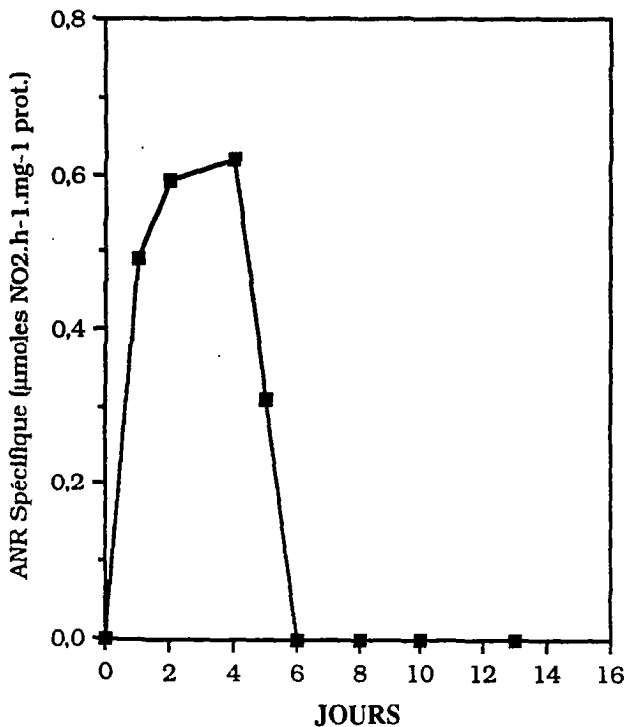
EVOLUTION DES ACTIVITES NR & GS
Suspension hétérotrophe en fioles



EVOLUTION DES ACTIVITES NR & GS
Suspension photomixotrophe en fioles



EVOLUTION DE L'ACTIVITE NR
Suspension hétérotrophe en bioréacteur



EVOLUTION DE L'ACTIVITE NR
Suspension photomixotrophe en bioréacteur

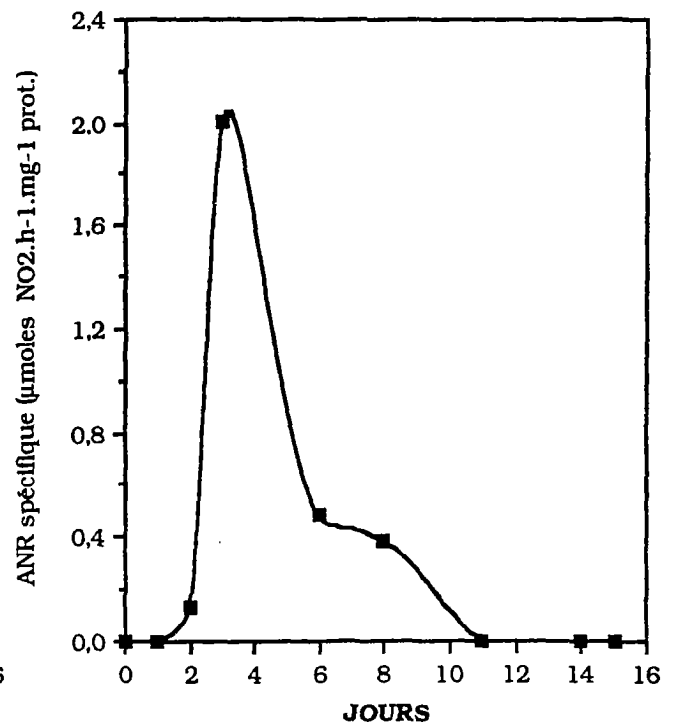


Figure n° 50 : Evolution comparée des activités nitrate réductase et glutamine synthétase

Dans des cellules de *Silene alba*, l'ANR est décelable dès la 12^e heure de culture, pour atteindre un maximum à la 48^{ème} heure (POULLE & RAMBOUR - 1979).

Sur des suspensions cellulaires photoautotrophes de *Chenopodium rubrum*, CAMPBELL *et al.* (1984) décrivent un pic dans l'activité NR au 4^e jour de culture. Dans ce cas, l'activité se maintient à son niveau maximal durant 8 jours avant de décroître.

L'existence d'une phase de latence avant l'apparition de l'activité enzymatique laisse supposer que l'enzyme est soit induite, soit activée lors du transfert des cellules sur un milieu neuf. L'utilisation des techniques récentes d'immunoenzymologie nous a permis d'apporter, sur notre matériel quelques réponses à ces problèmes. (Voir le chapitre E)

RAMBOUR *et al.* (1983) montrent clairement l'induction de la NR par les nitrates : dans des cultures de *Silene alba* sur un milieu dépourvu de nitrates, l'addition d'azote nitrique après 18h ou 46 heures de culture provoque l'apparition rapide d'une activité de réduction du nitrate.

Il est intéressant de remarquer que les cellules d'*Abrus* photomixotrophes, cultivées à la lumière, présentent, en fioles ou en bioréacteurs, des niveaux d'activité toujours supérieurs aux cellules hétérotrophes maintenues à l'obscurité.

Le rôle important de la lumière dans l'activité nitrate réductase a été souligné par de nombreux auteurs (voir la récente revue bibliographique de RAJASEKHAR & OELMULLER - 1987).

Il est aujourd'hui admis que la lumière et le nitrate agissent indépendamment dans la modulation de l'activité NR des plantes supérieures. Selon la littérature, cette action de la lumière est indépendante de la photosynthèse, mais elle est corrélée à une néosynthèse d'ANR et de protéines. Pour beaucoup d'auteurs, l'induction de la NR par la lumière serait le résultat de néosynthèses protéiques (régulation pré traductionnelle).

En séparant temporellement les traitements par la lumière et les nitrates, il a été possible de montrer que la lumière provoque la synthèse d'un "signal", qui reste occulté jusqu'à ce que la néosynthèse de l'enzyme soit induite par les nitrates. De plus, un traitement par les nitrates est plus efficace sur l'induction si il suit une période d'illumination. L'existence de ce "signal plastidial" permettrait d'expliquer le fait que la NR ne soit inducible par le NO_3 ou la lumière que pour des organes végétaux (germinations) ayant atteint un stade de développement suffisant.

A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant l'action de ce facteur supposé au niveau génomique, mais les récents développements de la biologie moléculaire permettent d'envisager cette étude avec des outils de plus en plus performants.

2) Relations avec la nutrition azotée :

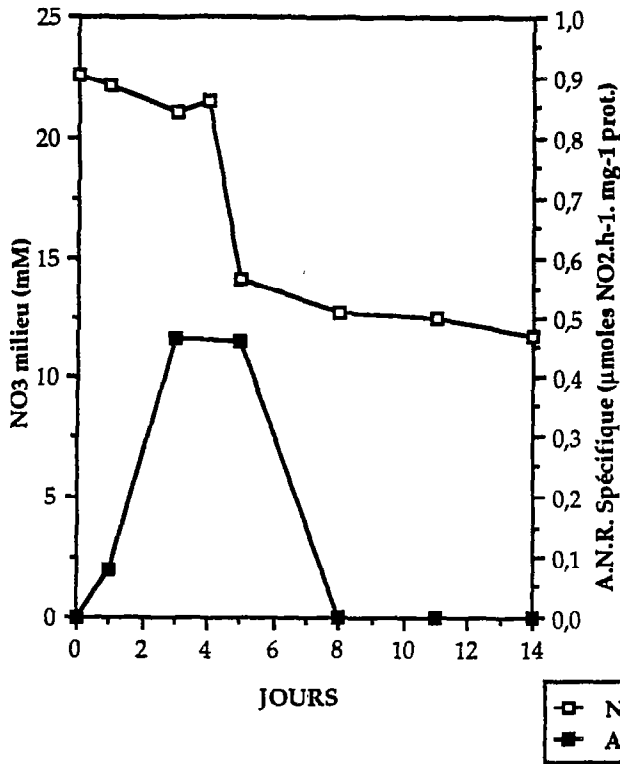
Il est intéressant de comparer, pour les suspensions photomixotrophes cultivées en fioles, l'évolution de la concentration en nitrates internes (Figure n° 38) et de l'activité nitrate réductase.

Le nitrate est accumulé dans la cellule dès le repiquage : ce pic de concentration précède donc de quelques heures l'apparition de l'activité NR.

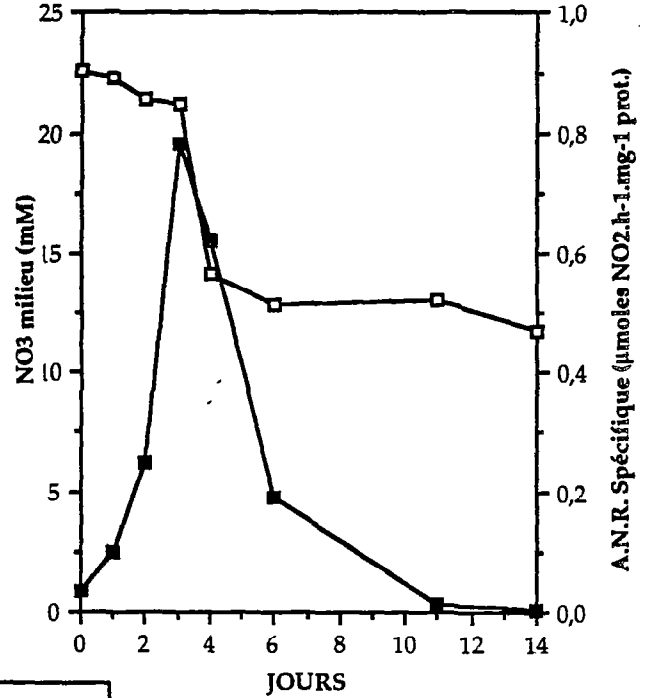
L'activité NR n'est plus décelable à partir du 11^e jour de culture, alors que les nitrates semblent être totalement épuisés dans la cellule. Les nitrates externes sont encore présents en grande quantité (plus de 10 mM), et continuent à diminuer, alors que la nitrate réductase n'est plus active.

JORDAN & FLETCHER (1980) montrent, sur une suspension cellulaire de *Rosa*, que la concentration en nitrates endocellulaires peut atteindre une concentration très faible

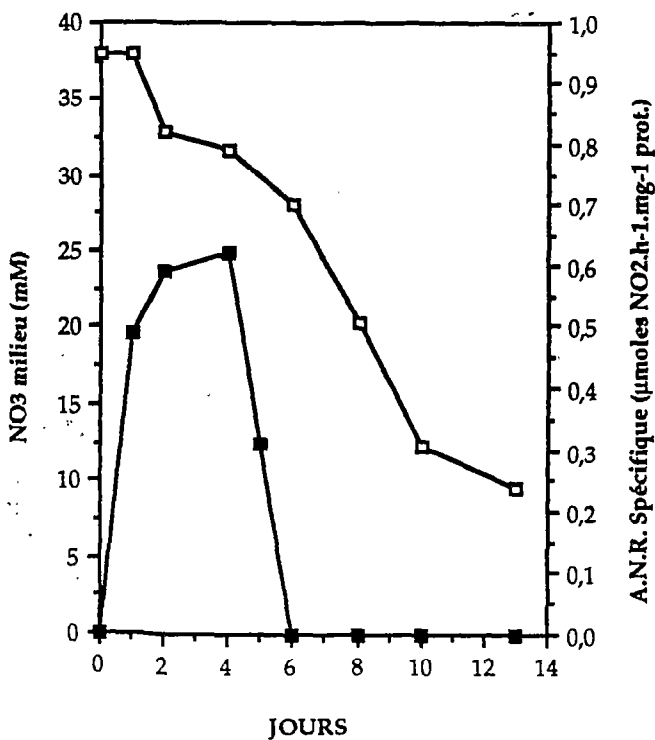
EVOLUTION DES NITRATES EXOCELLULAIRES ET DE L'ANR
Suspension hétérotrophe en fioles



EVOLUTION DES NITRATES EXOCELLULAIRES ET DE L'ANR
Suspension photomixotrophe en fioles



EVOLUTION DES NITRATES EXOCELLULAIRES ET DE L'ANR
Suspension hétérotrophe en bioréacteur



EVOLUTION DES NITRATES EXOCELLULAIRES ET DE L'ANR
Suspension photomixotrophe en bioréacteur

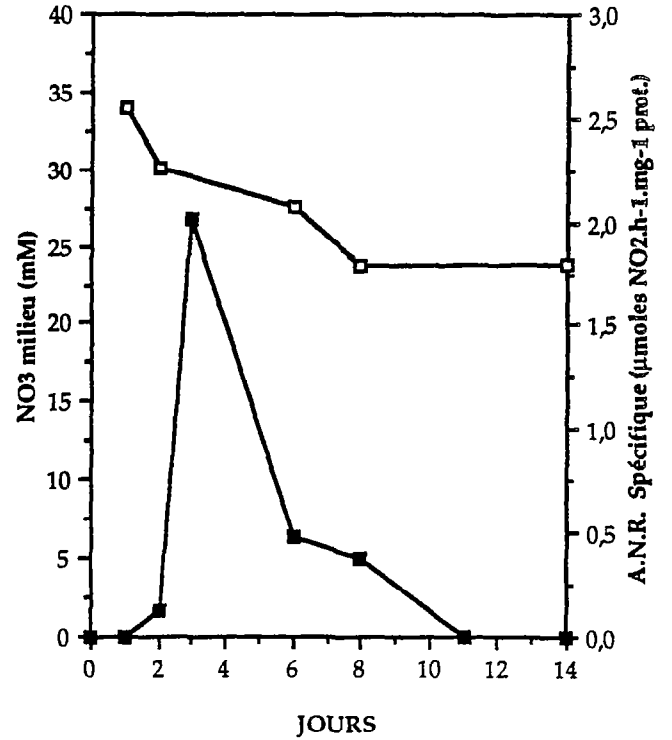


Figure n° 51 : Evolution comparée de l'activité nitrate réductase et du nitrate exocellulaire.

(< $1\mu\text{mole.g}^{-1}\text{ MF}$) en fin de phase exponentielle. Sur notre matériel végétal, il est possible qu'une telle concentration soit inaccessible au dosage. Il existerait alors un pool de nitrates internes très faible, alimentant la NR, qui n'est vraiment inactive qu'au 14^e jour. Quoi qu'il en soit, cette faible incorporation ne permet pas d'expliquer la disparition des NO_3 du milieu, qui ne se ralentit pas en fin de culture. Cependant, sur une autre culture photomixotrophe en erlenmeyer, nous avons pu montrer une stabilisation de la consommation en nitrates en fin de culture. (Figure n° 51)

Il est important de noter que l'activité Nitrate réductase s'arrête, alors que le nitrate est présent encore en grande quantité dans le milieu.

Récemment, l'existence d'une nitrate réductase liée à la membrane plasmalemmique a été suggérée. Cette activité, échappant à notre dosage pourrait être impliquée dans la consommation des ions NO_3^- que nous avons mise en évidence, alors que la NR cytosolique ne montre plus aucune activité.

De nombreuses études ont montré que les plantes entières étaient incapables de réduire la totalité des nitrates présent dans leur milieu, et que leurs tissus deviennent senescents alors qu'ils sont encore riches en nitrates (BEEVERS & HAGEMAN - 1980)

Pour ROBIN *et al.* (1983), le nitrate intracellulaire n'est jamais un facteur limitant pour l'expression de l'activité NR.

Un déficit énergétique dans la cellule pourrait alors être mis en cause.

En effet, les résultats présentés par HARDY-CLARIS (1988) sur notre matériel végétal mettent en évidence une chute du pool en nucléotides adényliques totaux (ATP+ADP) en fin de phase exponentielle de croissance ; cette évolution est la même pour les quatre types de cultures étudiés.

Les cellules autotrophes de *Chenopodium rubrum* décrites par CAMPBELL & SMARELLI (1986) constituent un modèle très intéressant : en effet, dans un système autotrophe, l'approvisionnement en énergie n'est pas limitant. Cependant, l'évolution de l'activité NR suit le même schéma que dans des cultures hétérotrophes, ou dans notre système photomixotrophe.

Chez *Abrus precatorius*, dans tous les cas (hétéro & mixotrophe) le pic d'activité apparait en début de culture, indépendamment des variations de l'activité photosynthétique, et des modifications qu'ils induisent dans le métabolisme cellulaire.

L'incorporation des nitrates suit apparemment les mêmes voies dans les différents types de cellules ; seul, le niveau d'activité de la nitrate réductase varie.

Si l'on considère les vitesses moyennes de consommation en nitrate et les activités NR maximales mesurées dans les différents types de cultures, il est possible de mettre en évidence, dans les suspensions en fioles une corrélation entre ces deux paramètres. Les différences entre les lignées hétéro et mixotrophes pour la consommation en nitrates se retrouvent au niveau des activités NR maximales.

Dans les suspensions cultivées en bioréacteurs, la relation est moins nette : il semblerait, dans ces cultures, que le passage en conditions de photomixotrophie influence l'activité NR sans modifier pour autant l'intensité de l'alimentation en nitrates des cellules.

	Suspension hétérotrophe en fioles	Suspension hétérotrophe en bioréacteur	Suspension photomixotrophe en fioles	Suspension photomixotrophe en bioréacteur
Activité Nitrate Réductase Spécifique maximale (μ moles NO_2 .h-1.mg-1 prot.)	0,45	0,6	0,8	2
Nucléotides Totaux (inoculation) (nanomoles.g-1 MS)	300	300	100	80
Nucléotides Totaux (maximum) (nanomoles.g-1 MS)	900	700	375	420
Facteur multiplicatif (nucléotides totaux)	x 3,0	x 2,3	x 3,7	x 5,0
NAD + NADH (inoculation) (nanomoles.g-1 MS)	230	200	20	20
NAD + NADH (inoculation) (nanomoles.g-1 MS)	780	680	400	250
Facteur multiplicatif (nucléotides totaux)	x 3,4	x 3,4	x 20	x 12,5

Tableau n° 10 : Comparaison de l'activité nitrate réductase maximale et du taux en nucléotides pyrimidiques totaux et de la somme (NAD + NADH)

	Suspension hétérotrophe en fioles	Suspension photomixotrophe en fioles	Suspension hétérotrophe en bioréacteur	Suspension photomixotrophe en bioréacteur
Vitesse moyenne de consommation du nitrate ($\mu\text{mole.jour}^{-1}.\text{g}^{-1}$ PMF)	5,4	7,5	25,7	23,8
Activité Nitrate Réductase maximale ($\mu\text{moles NO}_2. \text{h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ prot.)	0,48	0,78	0,62	2,0

Tableau n°9 : Comparaison des vitesses moyennes de consommation en nitrates et de l'activité nitrate réductase dans différents types de cultures.

3) Relations avec le pouvoir réducteur de la cellule :

Il nous importe donc de savoir quelles différences portant sur divers paramètres biochimiques permettent d'expliquer cette différence dans le niveau d'activité.

Dans les quatre types de cultures étudiées, I. HARDY-CLARIS (1988) note une très forte augmentation de la concentration en nucléotides pyridiniques totaux au cours des premières 48 heures de la culture (voir Annexe D).

Durant cette phase, les formes oxydées (NAD^+), se trouvent toujours en plus grande quantité que les formes réduites (NADH), traduisant ainsi une consommation importante en NADH . Le début de la phase exponentielle se traduit par une reprise rapide d'un métabolisme très actif, la néosynthèse massive de nucléotides accompagnant d'autres phénomènes tels que synthèse de nucléotides pyridiniques phosphorylés, synthèses protéiques, apparition d'activités enzymatiques nouvelles...

Le tableau n° 10 permet de comparer les activités Nitrate Réductase et les teneurs en nucléotides pyridiniques totaux à l'ensemencement, et maximales (durant la phase exponentielle) pour les différents types de cultures étudiés.

A la lecture de ce tableau, il apparaît que les facteurs de multiplication du taux en nucléotides pyridiniques totaux et non phosphorylés ($\text{NAD} + \text{NADH}$) sont supérieurs pour les cultures en bioréacteur.

Le facteur de multiplication de la somme ($\text{NAD} + \text{NADH}$) permet de mettre en évidence, dans chaque type de culture, l'activité de synthèse du substrat spécifique de la NR.

Cette synthèse en nucléotides totaux comme en composés non phosphorylés suit la même évolution, d'une culture à l'autre, que l'activité NR maximale.

Par conséquent, la culture des cellules en conditions de photomixotrophie peut induire une augmentation de l'activité NR *via* une synthèse accrue de molécules pyridiniques (NADH), agissant sur la NR comme donneurs physiologiques d'électrons.

4) Influence de l'aération des cultures :

Nous avons précédemment mis en évidence une augmentation de l'activité NR maximale lors de transfert des cellules d'une atmosphère confinée (fioles bouchées) vers un bioréacteur agité et aéré. Un effet de l'oxygénation du milieu sur l'activité NR peut être recherché.

WATT *et al.* (1986) observent, sur des feuilles de *Zea mays* L., une inhibition de la NR en conditions d'anaérobiose, supprimée par un apport de O_2 exogène. Ces auteurs impliquent les taux en ADP et en NADH intracellulaires dans cet effet.

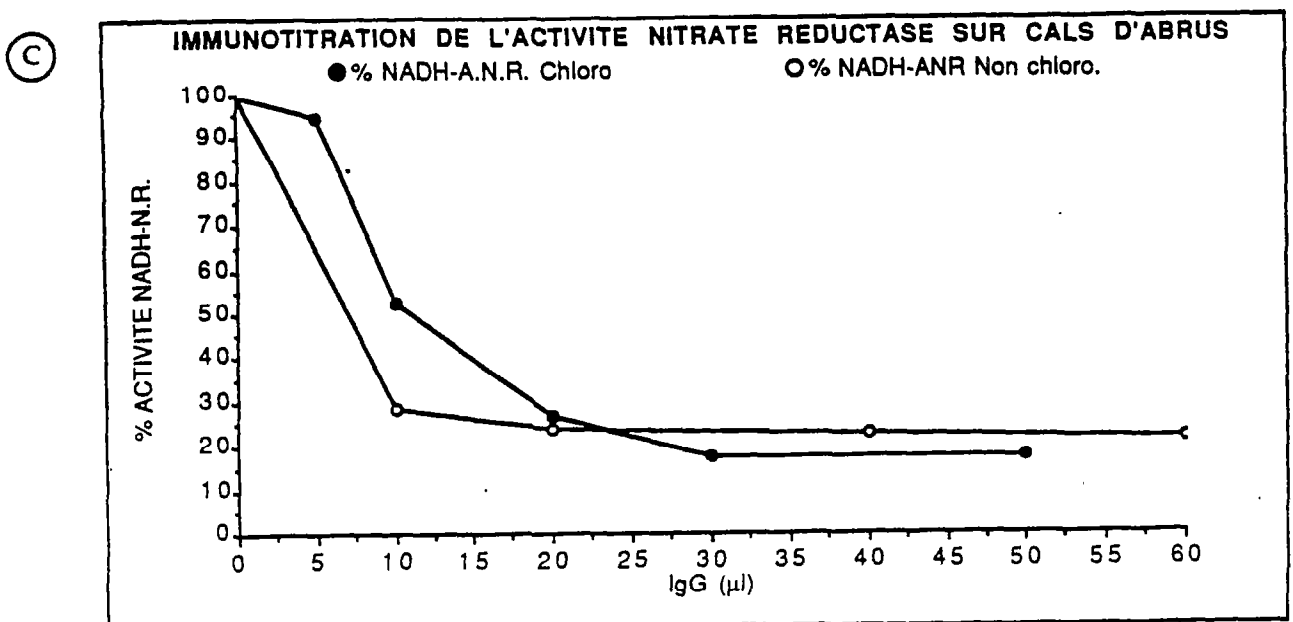
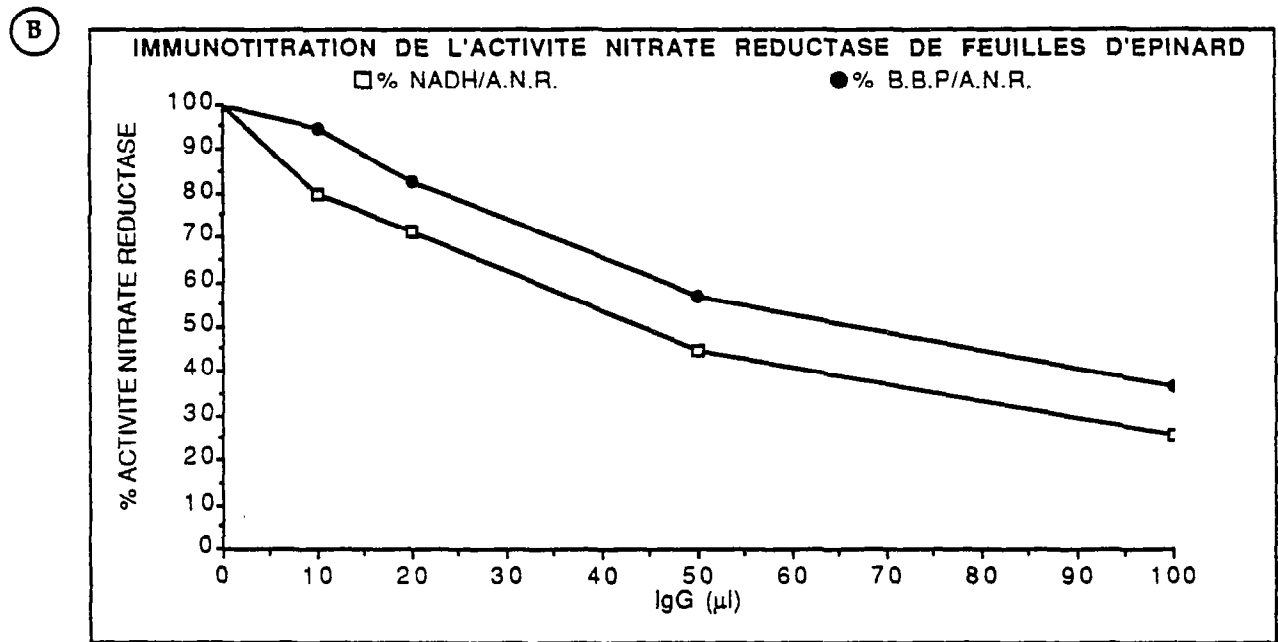
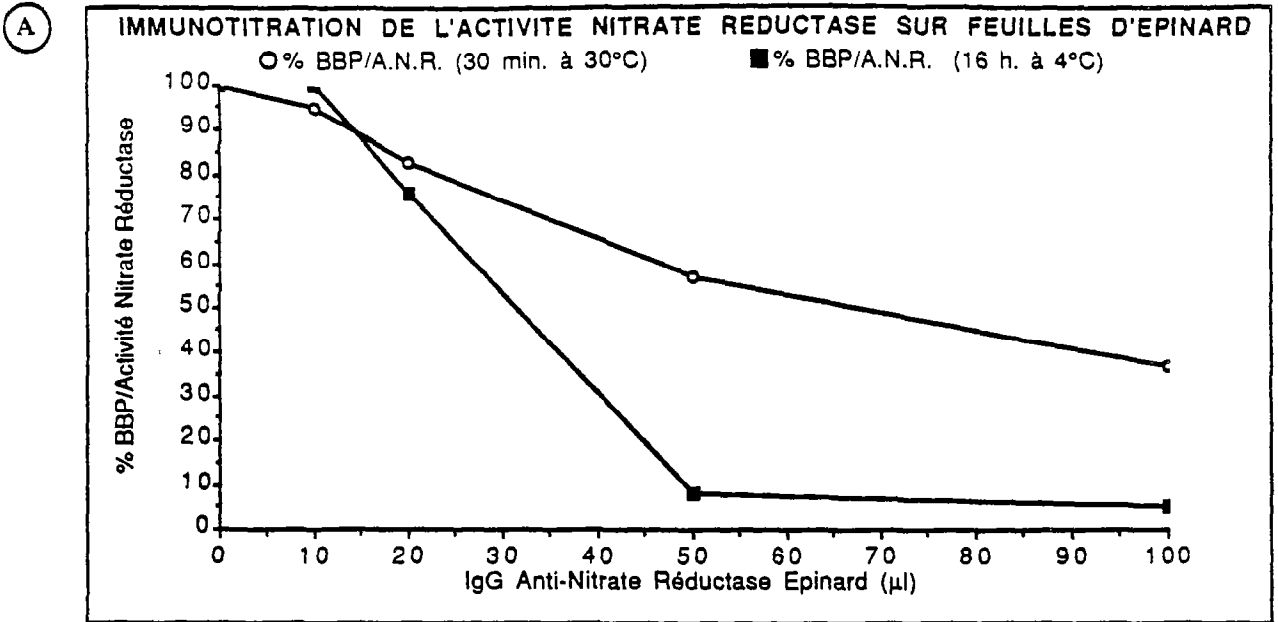


Figure n° 52 : Immunotitration des activité BBP-NR & NADH-NR

D'autres auteurs (MANN *et al.* - 1979; KENIS & TRIPPI - 1986) montrent, à l'inverse, une inhibition de l'activité NR par l'oxygène sur des feuilles d'Epinaud et d'Orge, respectivement. Cette action de l'oxygène est attribuée à la synthèse à la lumière de protéines inhibitrices, et/ou à des modifications de la perméabilité membranaire au NADH et au nitrate, ou, enfin à des photooxydations des groupements SH de la NR.

Par ailleurs, sur les cultures cellulaires d'*Abrus*, le transfert fioles/réacteur n'induit pas de profonds changements sur la synthèse de nucléotides pyridiniques.

Ces changements, s'ils existent, ne convergent pas vers un modèle cohérent pouvant expliciter les différences d'activité NR entre cultures en fioles et en bioréacteur.

c) Propriétés immunoenzymologiques:

L'ensemble des résultats concernant la caractérisation immunoenzymologique de la nitrate réductase d'*Abrus precatorius* a été obtenu grâce à la collaboration de J. HOARAU, D. LAVERGNE & A. NATO au Laboratoire de Structure et Métabolisme des Plantes de l'Université de PARIS XI (ORSAY).

Le but de ces expérimentations est de réaliser une caractérisation immunologique de la NR extraite de notre matériel végétal afin de pouvoir par la suite réaliser une quantification précise de la NR au cours des cultures par TEST ELISA.

1) Immunotitration des activités BBP-NR & NADH-NR :

(Figure n° 52)

Nota; Afin de parfaire la méthode d'immunoprécipitation, nous avons réalisé divers tests préliminaires sur un extrait foliaire d'Epinaud, riche en NR. La méthode a été ensuite transposée sur notre matériel végétal.

- Sur feuilles d'Epinaud :

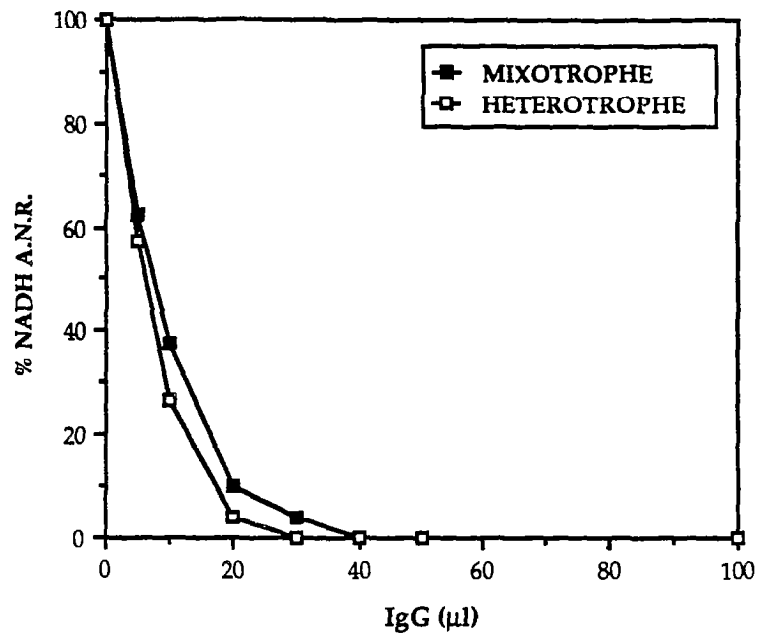
L'immunotitration est réalisée à l'aide d'un antisérum de lapin contenant des IgG Anti-Nitrate Réductase de feuilles d'Epinaud. Pour un volume total de 900 µl, on incube 200 µl d'extrait enzymatique concentré (ultrafiltration après précipitation au sulfate d'ammonium 20-40%) avec un titre croissant d'IgG (0 à 100µl d'antisérum dilué 5 fois). 100 µl d'une solution de KNO₃ 100mM sont rajoutés. Une incubation-témoin est réalisée avec les mêmes concentrations en sérum pré-immun. L'incubation est réalisée à 30°C durant 30 minutes. L'activité NADH-NR restante est alors mesurée en rajoutant 100 µl d'une solution de NADH 8mM, suivant le protocole précédemment décrit.

Nous avons comparé, sur un extrait foliaire purifié d'Epinaud, deux conditions d'incubation antigène/IgG (durée-température). Sur cet extrait, une incubation de 15 heures, au froid (4° C), a permis d'immunoprécipiter la totalité de l'activité, alors que 40% environ de l'activité restait présente après une incubation de 30 minutes à 30°C (Figure n° 52-A).

Une immunotitration des activités NADH-NR et BBP-NR a ensuite été réalisée sur le même extrait (Figure n° 52-B). On montre, conformément à d'autres auteurs, (MEYER *et al.* 1987) que l'immunoprécipitation de l'activité BBP-NR demande une quantité d'IgG plus grande. Ce résultat suggère l'existence de sites actifs différents pour le NADH et le BBP sur la molécule de NR.

Il est important de noter que cette activité est nettement inhibée par l'action des IgG considérés. En effet, MEYER et ses collaborateurs notent, dans quelques cas, une réaction d'hyperactivité de la BBP-NR, sous l'action d'anticorps mono- et polyclonaux.

IMMUNOTITRATION DE LA NADH-NR (CELLULES d'ABRUS)



IMMUNOTITRATION DES ACTIVITES BBP-NR & NADH-NR

Cellules hétérotrophes (3jours)

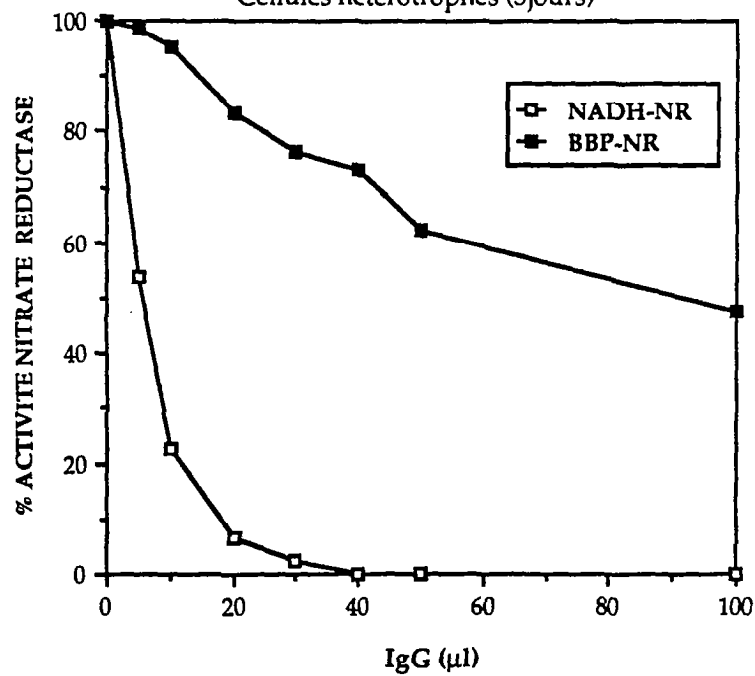


Figure n° 53 : Immunotitration des activité BBP-NR & NADH-NR extraites de suspensions cellulaires d'Abrus.

Cet effet pourrait être dû à des déformations allostériques de la protéine sous l'action de certains anticorps, rendant certains de ses sites actifs plus accessibles au substrat.

Ces premiers tests, effectués sur des extraits foliaires d'Epinard, nous ont permis de fixer les conditions de l'incubation antigène-anticorps et la gamme de dilution de l'IgG anti-NR à utiliser. Nous avons pu, sur ce même matériel, mettre en évidence des différences entre activité NADH-NR et BBP-NR.

- Sur cals d'Abrus :

Une immunotitration a été réalisée sur des extraits concentrés provenant de cals de prolifération d'*Abrus precatorius* chlorophylliens ou non, âgés de 10 jours. Les courbes d'immunotitration présentent une évolution sensiblement comparable. (Figure n° 52-C)

La courbe présentée n'a pas été réalisée à teneur en protéines égales au 100%. Si l'on calcule la quantité d'IgG nécessaire à la précipitation de 50% de l'activité NR pour la même quantité de protéines, on trouve la même valeur pour les deux extraits. (L'extrait chlorophyllien contient 1,7 fois plus de protéines solubles que l'extrait non chlorophyllien.)

Dans des cultures statiques *in vitro* d'*Abrus precatorius*, on ne note donc pas de différences immunologiques importantes sur la nitrate réductase extraite de cals chlorophylliens ou non.

- Sur des suspensions cellulaires d'Abrus : (Fig. n° 53)

Nous avons testé deux extraits cellulaires concentrés provenant de suspensions de la lignée 6H, hétérotrophes ou mixotrophes, âgées de 3 jours. Nous avons réitéré sur ce matériel les expérimentations précédemment tentées sur les cals.

Les courbes d'immunoprécipitation obtenues pour les cellules hétérotrophes et photomixotrophes présentent un profil similaire, suggérant des formes antigéniques de NR semblables pour les deux types de cellules.

L'immunoprécipitation de la BBP-NR nécessite, comme pour les cals, des quantités d'IgG nettement plus importantes que celles utilisées pour la NADH -NR. L'incubation est réalisée à 4° C durant 16 heures.

A la lumière des résultats obtenus chez les cals et les suspensions cellulaires d'*Abrus precatorius*, il est permis d'affirmer que la nitrate réductase présente, dans ces deux cas, une forme antigénique semblable.

De plus, le passage à la photomixotrophie ne semble pas induire de modification structurale importante sur la NR. Ce phénomène s'explique aisément, du fait même que les deux types de culture sont issus de la même lignée cellulaire de départ (6H) et sont parfaitement réversibles. La parenté immunologique alors mise en évidence s'explique aisément. Ce résultat demande à être confirmé par des tests de reconnaissance croisée de type OUCHTERLONY.

Les tests d'immunoprécipitation ont été largement utilisés pour caractériser et quantifier les différentes formes de NR présentes dans les extraits bruts ou purifiés (FERRARIO *et al.* - 1983; SOMERS *et al.* - 1983 b; POULLE & RAMBOUR - 1985).

Les courbes d'immunotitration peuvent constituer un outil intéressant pour la mise en évidence de formes inactives de nitrate réductase. A cette fin, il suffit de superposer une courbe d'immunotitration d'un extrait actif (E.A) avec celle obtenue avec le même extrait auquel on a rajouté une quantité connue d'extrait inactif (E.I.). Si les deux courbes

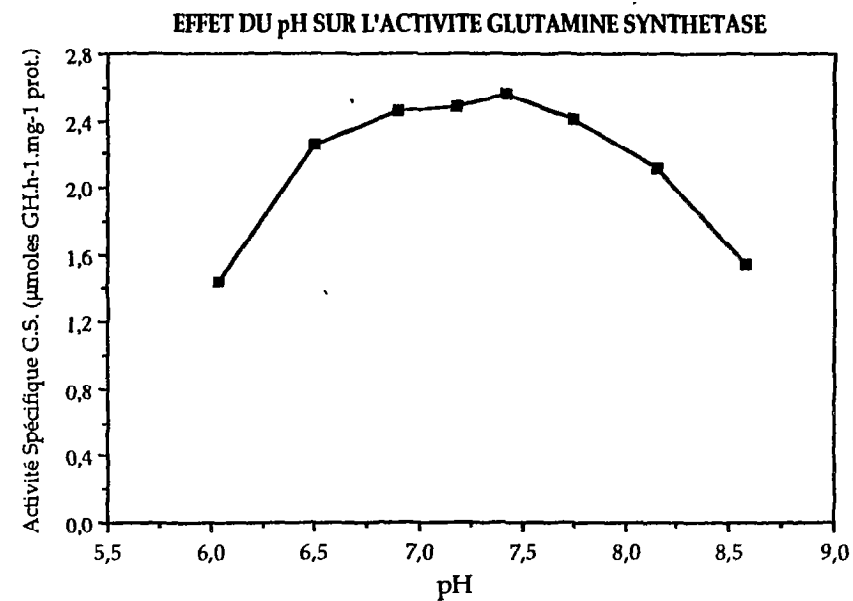
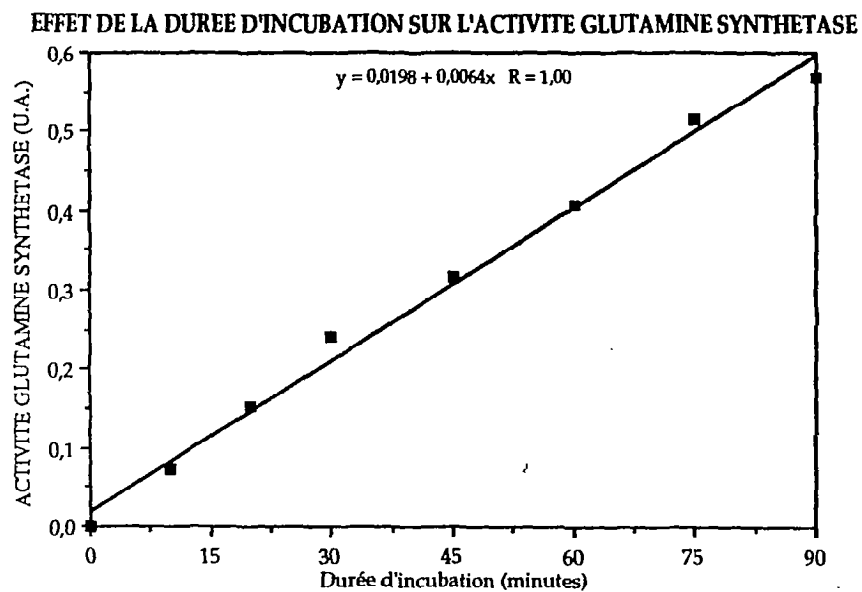
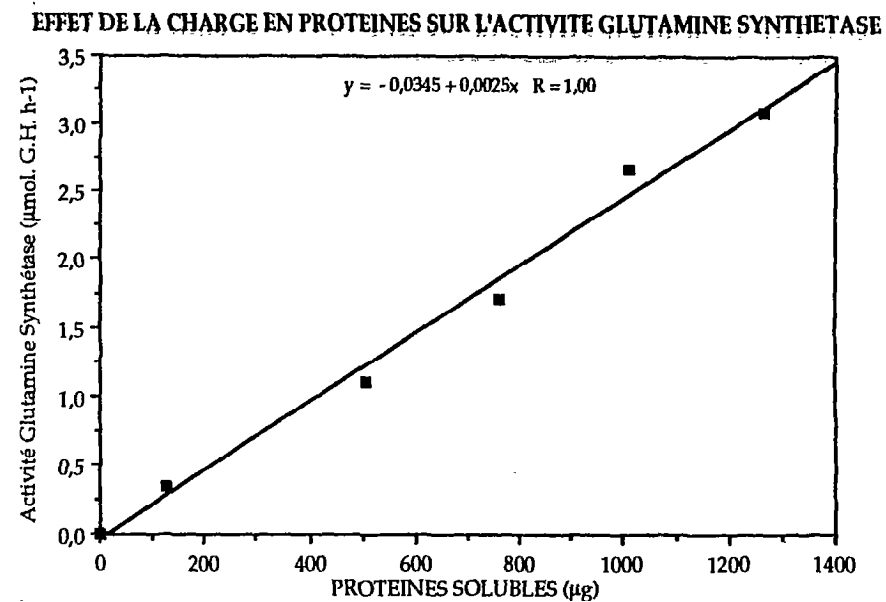
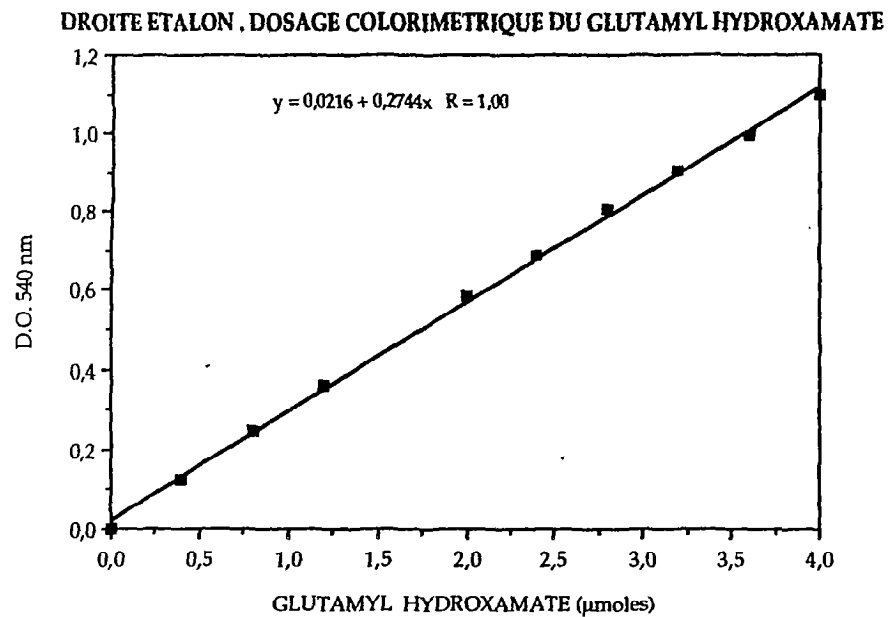


Figure n° 54 : Quelques caractéristiques de la Glutamine Synthétase extraite de cals chlorophylliens d'*Abrus precatorius*.

sont superposables, c'est que l'extrait inactif ne mobilise pas d'anticorps, il ne contient donc pas de nitrate réductase; sa faible activité est donc due à l'absence de l'enzyme (turnover).

Si, par contre, il faut plus d'IgG pour inactiver l'extrait E.A +E.I. que pour l'extrait actif seul, alors l'extrait inactif contient de la NR. On met ainsi en évidence la présence de nitrate réductase sous forme inactive dans l'extrait EI.

Le peu de temps imparti à cette étude immunoenzymologique, et la faible quantité de matériel végétal alors disponible en Métropole ne nous ont pas permis de conduire de telles expérimentations dans le cadre de notre travail.

2) La Glutamine Synthétase :

La Glutamine synthétase joue un rôle important, en association avec d'autres systèmes enzymatiques (GOGAT; GDH), dans l'assimilation de l'ammonium vers les protéines. De plus, la localisation chloroplastique de l'une de ses isoformes (GS₂) en fait une enzyme marqueur digne d'intérêt pour l'étude de l'efficacité de l'équipement plasticiel (voir le Chapitre "Données bibliographiques; § D-2).

a) caractérisation partielle de l'enzyme :

Dans un premier temps, nous avons vérifié, dans nos conditions de mesure, la linéarité du dosage colorimétrique du γ -Glutamylhydroxamate. La Figure n° 54 -A montre une droite étalon d'équation:

$$\gamma\text{GH} = 3,64 \times \text{D.O. } 540 \text{ nm} - 0,79 \quad \text{coefficient de corrélation } r = 0,999$$

où γGH représente la quantité de γ glutamyl hydroxamate en micromoles

Afin de simplifier les protocoles d'extraction pour les différents systèmes enzymatiques (NR, GS, Rubisco, PEPc) étudiés en cours de culture, nous avons utilisé le même tampon d'extraction pour doser les activités carboxylases et l'activité glutamine synthétase.

En accord avec les données bibliographiques disponibles (ELLIOT - 1953; McNALLY *et al.* - 1983 a; HIREL - 1984) ce tampon présente les caractéristiques suivantes: Tris-HCl (100 mM) pH 7,6; DTT: 1mM; EDTA : 1mM; Mg^{2+} : 1mM; PMSF : 250 μ M.

Il nous a fallu, dans un premier temps vérifier l'adéquation de ce choix avec les caractéristiques générales de l'enzyme.

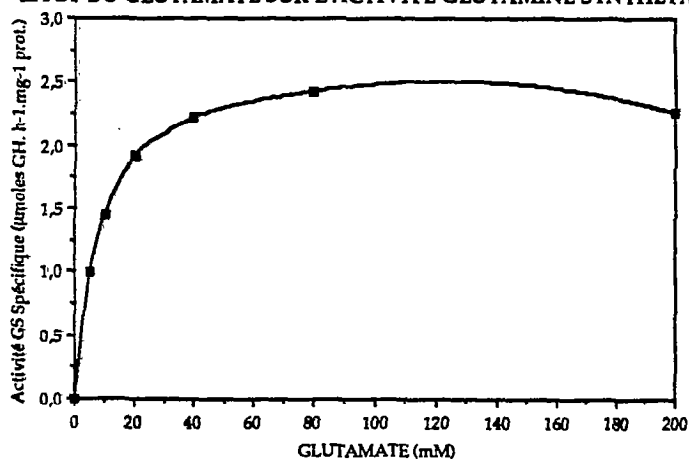
1) *pH optimum* : (Figure n° 54- D)

Une gamme de pH de 6,04 à 8,58 est réalisée à l'aide d'un tampon MES -Tris 100 mM.

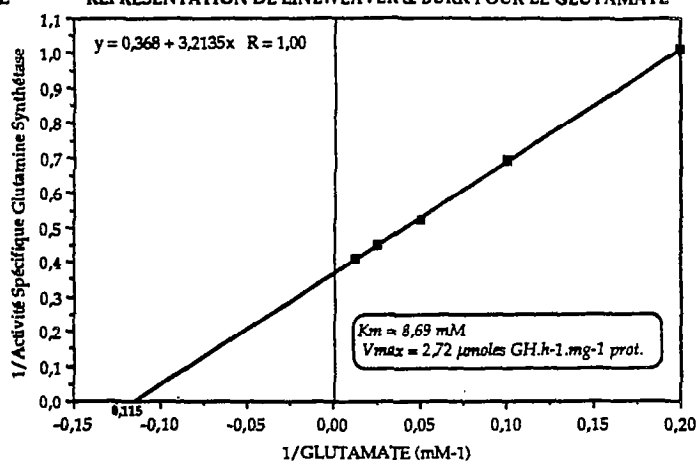
La glutamine synthétase extraite de cals chlorophylliens d'*Abrus precatorius* présente un pH optimal à 7,5. L'activité de l'enzyme semble par ailleurs peu sensible aux variations de pH pour les valeurs comprises entre 7,0 et 8,0.

Ce résultat est en accord avec les données de ELLIOT (1953) et de KANAMORI & MATSUMOTO (1972) travaillant respectivement sur des fruits de pois et des racines de riz.

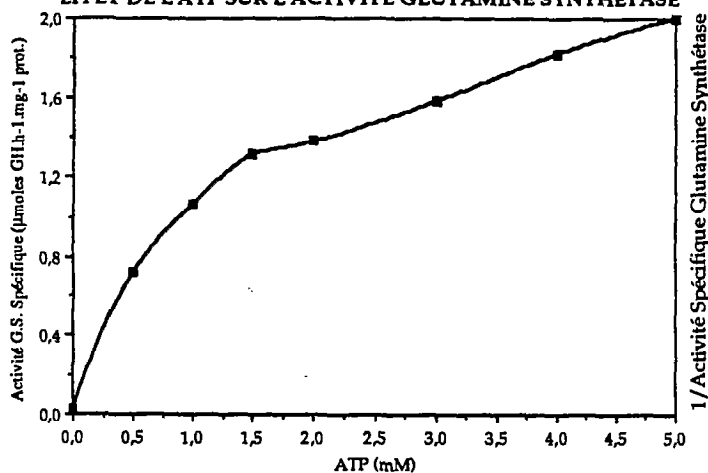
EFFET DU GLUTAMATE SUR L'ACTIVITE GLUTAMINE SYNTHETASE



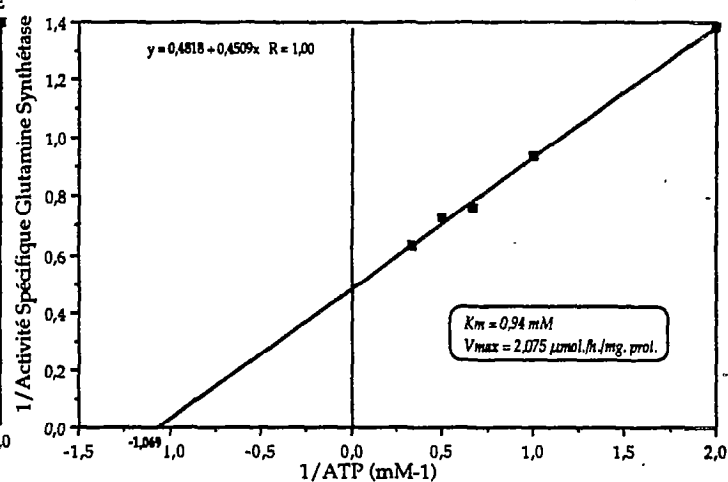
REPRESENTATION DE LINEWEAVER & BURK POUR LE GLUTAMATE



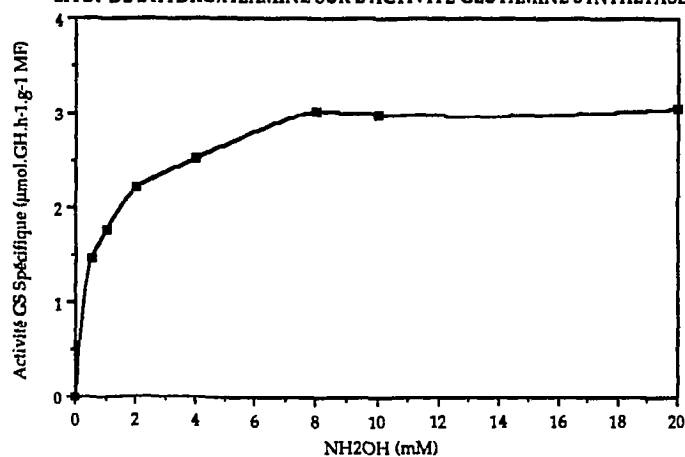
EFFET DE L'ATP SUR L'ACTIVITE GLUTAMINE SYNTHETASE



REPRESENTATION DE LINEWEAVER & BURK POUR L'ATP



EFFET DE L'HYDROXYLAMINE SUR L'ACTIVITE GLUTAMINE SYNTHETASE



REPRESENTATION DE LINEWEAVER & BURK POUR L'HYDROXYLAMINE

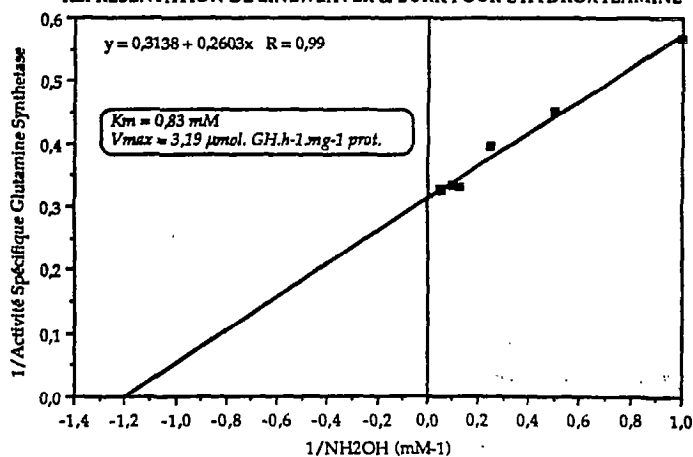
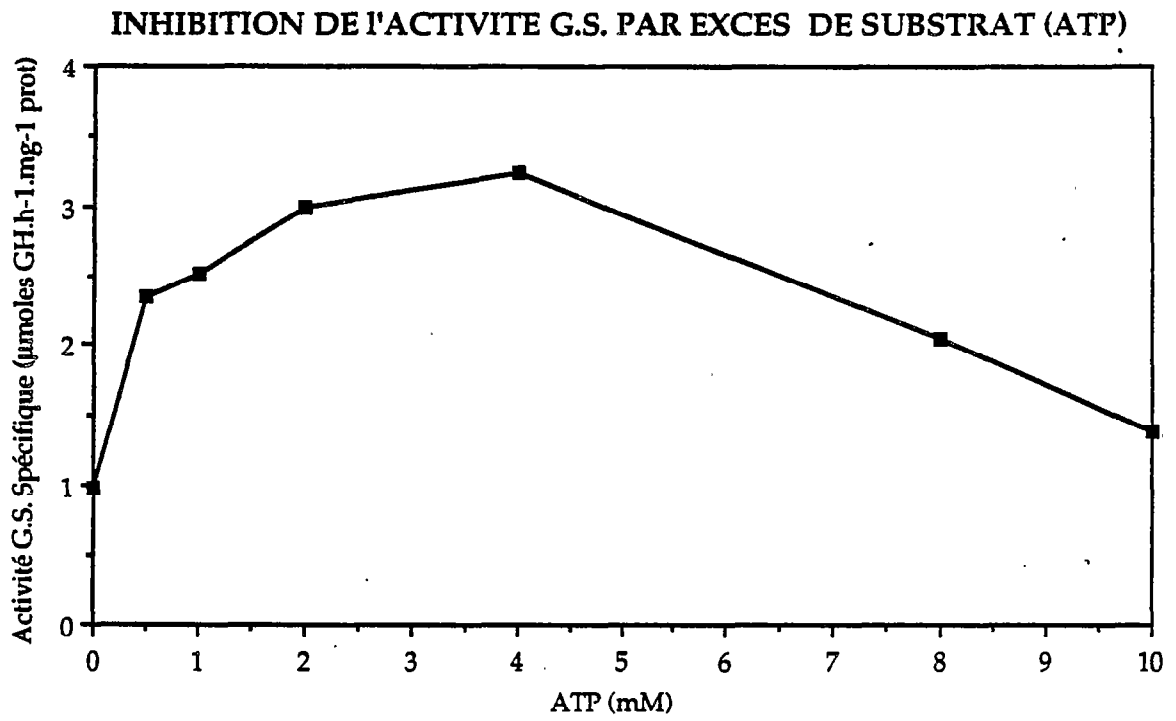


Figure n° 55 : Détermination des constantes d'affinité de la GS pour le glutamate, l'ATP, et l'hydroxylamine.

Figure n° 56 :



2) Conditions de linéarité de la mesure d'activité :

(Figures n° 54 -B & C)

Dans nos conditions de mesure, le dosage d'activité GS est linéaire durant au moins 90 minutes, pour une teneur en protéines solubles dans l'extrait pouvant atteindre 1400 µg.

3) Mesure des constantes de Michaelis-Menten pour le glutamate, l'hydroxylamine, et l'ATP : (Figure n° 55)

Afin de vérifier si les substrats et cofacteurs utilisés étaient en concentrations saturantes lors de la mesure *in vitro* de l'activité Glutamine Synthétase, nous avons cherché à déterminer les constantes d'affinité de l'enzyme pour le glutamate, l'ATP et l'hydroxylamine.

Ces mesures ne doivent pas être considérées pour leur stricte valeur biochimique; elles ont été réalisées sur des extraits bruts, sans aucune étape de purification. Leur but est de renseigner sur l'adéquation de notre méthode de mesure d'activité.

* Km et Vmax pour le glutamate :

Le Km apparent de la GS pour le glutamate est de 8,7 mM environ pour notre matériel végétal. La vitesse maximale de la réaction, déterminée graphiquement, est de 2,72 µmoles de γGH produites par heure et par mg de protéines.

* Km et Vmax pour l'hydroxylamine :

Nous avons déterminé pour l'hydroxylamine (équivalent de l'ammonium pour la détermination *in vitro* de l'activité) des valeurs pour le Km variant de 0,6 à 1,3 mM, et de 3,2 à 5,9 µmoles γGH.h⁻¹.mg⁻¹ prot. pour la vitesse maximale de réaction.

* Km et Vmax pour l'ATP :

Le Km apparent pour l'ATP de la glutamine synthétase extraite de cals chlorophylliens d'*Abrus precatorius* varie de 0,45 à 0,94 mM (Vmax de 2,75 à 3,63 µmoles γGH.h⁻¹.mg⁻¹ prot.)

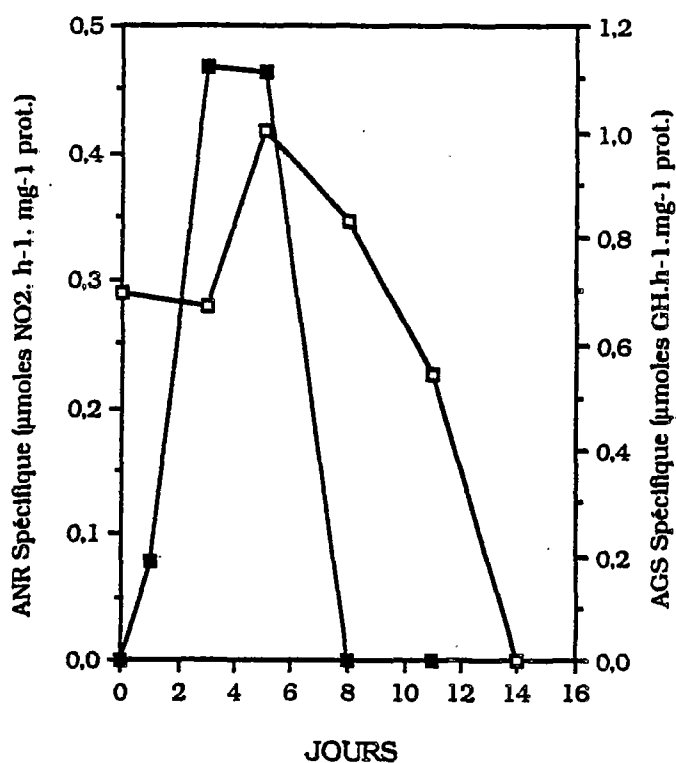
Ces mesures de constantes de Michaelis de la GS pour ses différents substrats et cofacteurs nous permettent de considérer comme saturantes les concentrations en ces composées utilisées lors de l'incubation *in vitro* de l'enzyme (glutamate : 80 mM, Hydroxylamine : 6 mM, ATP : 5 mM).

La GS semble présenter une cinétique de type Michaelien pour les trois substrats considérés. La glutamine synthétase montre une nette inhibition par excès de substrat pour les concentrations en ATP supérieures à 5 mM (Fig. n° 56). Nous utiliserons cette concentration limite pour l'incubation *in vitro* de l'enzyme.

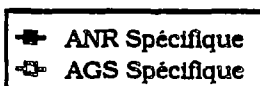
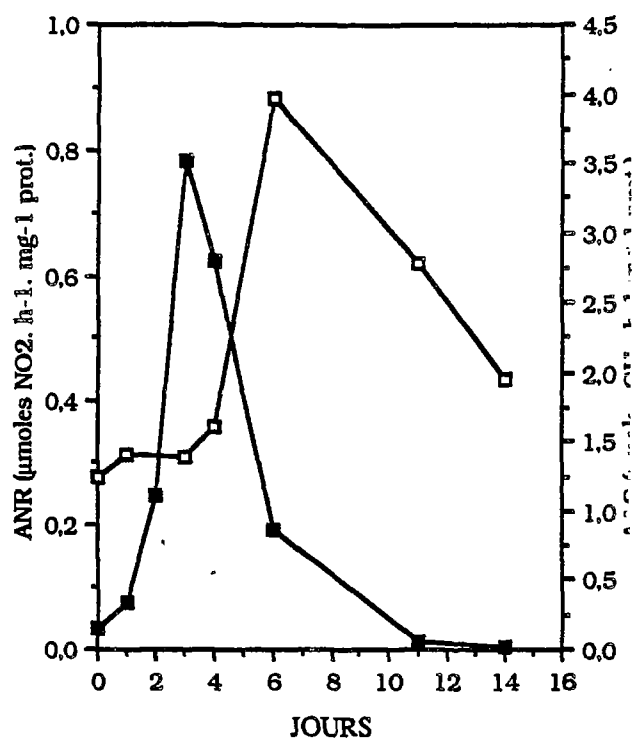
Les valeurs des constantes d'affinités estimées sur notre matériel végétal sont du même ordre, mais légèrement supérieures à celles publiées par KANAMORI & MATSUMOTO (1972) concernant la glutamine synthétase extraite de racines de riz. Ces auteurs déterminent à l'aide de droites de Lineweaver & Burk les valeurs de Km suivantes : 3,75 mM pour le glutamate, 0,44 mM pour l'ATP, et 0,4 mM pour l'hydroxylamine.

D'une manière générale, l'affinité estimée dans les cultures cellulaires *in vitro* est toujours beaucoup plus faible que celle rencontrée dans les plantes entières. Ce phénomène a été vérifié pour de nombreux systèmes enzymatiques (NR, GS, GOGAT, carboxylases, phosphatases, PAL...). De plus, il convient de rappeler que ces mesures de constantes ont été réalisées sur des extraits bruts, et que leur valeur en termes de biochimie, est donc discutable.

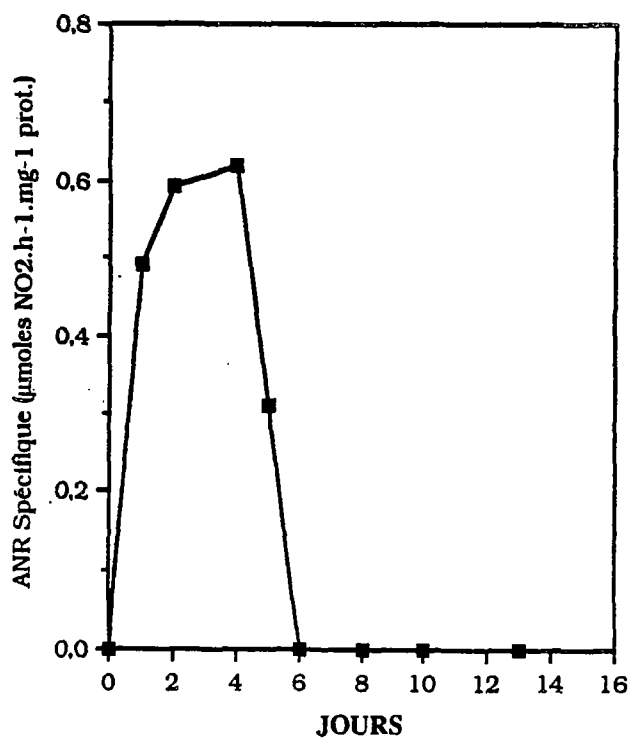
EVOLUTION DES ACTIVITES NR & GS
Suspension hétérotrophe en fioles



EVOLUTION DES ACTIVITES NR & GS
Suspension photomixotrophe en fioles



EVOLUTION DE L'ACTIVITE NR
Suspension hétérotrophe en bioréacteur



EVOLUTION DE L'ACTIVITE NR
Suspension photomixotrophe en bioréacteur

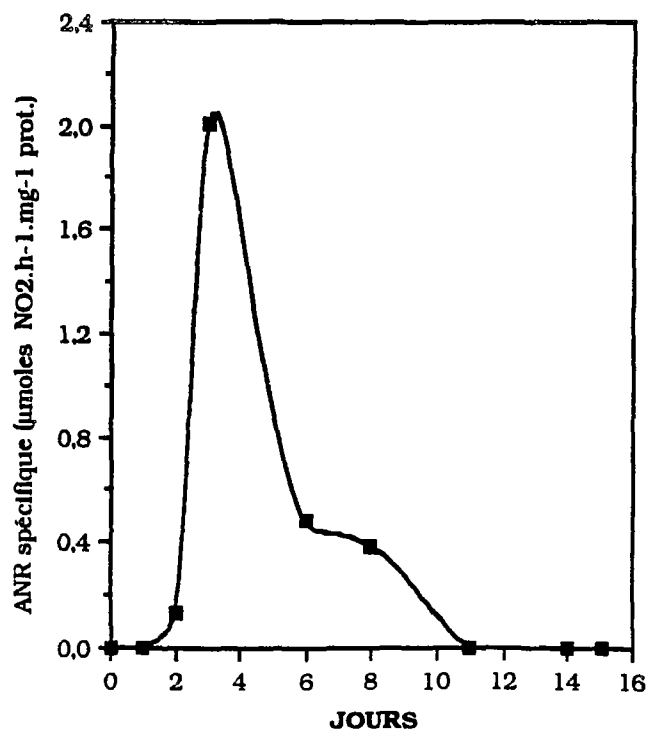


Figure n° 50 : Evolution comparée des activités nitrate réductase et glutamine synthétase

Sur notre matériel végétal, le K_m de la glutamine synthétase pour le glutamate présente une valeur assez forte : 8,7 mM. Il est néanmoins intéressant de remarquer que le rapport des K_m pour le glutamate d'une part, et pour l'hydroxylamine et l'ATP d'autre part est de 10 environ, confirmant ainsi les résultats de KANAMORI et MATSUMOTO (1972) sur la GS de racines de riz.

b) Evolution de l'activité glutamine synthétase dans des cultures cellulaires hétéro et mixotrophes cultivées en fioles d'erlenmeyer:
(Figure n° 50)

Dans ces deux types de cultures cellulaires, la glutamine synthétase présente, après un temps de latence de 4 à 5 jours, un pic d'activité visualisable vers le sixième jour de culture. L'AGS spécifique est ainsi multipliée par 1,5 dans les cellules hétérotrophes, et par 2,5 dans les cellules photomixotrophes.

Si les courbes d'évolution sont semblables, le niveau d'activité maximum diffère nettement d'une culture à l'autre : en effet, il atteint 4,2 $\mu\text{moles de } \gamma\text{GH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ pour les cellules photomixotrophes, alors qu'il est seulement de 1,15 $\mu\text{moles de } \gamma\text{GH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ dans l'autre culture.

L'activité GS présente, pour les deux types de culture, un niveau d'activité semblable à l'inoculation (2,9 $\mu\text{moles de } \gamma\text{GH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$). En fin de culture, les suspensions hétérotrophes présentent une activité nulle, alors que l'AGS revient à son niveau initial dans les suspensions photomixotrophes.

Dans les deux types de cultures considérés, le pic d'activité de la glutamine synthétase apparaît toujours décalé dans le temps par rapport à l'activité nitratre réductase. Ce décalage est plus marqué pour les suspensions photomixotrophes, où l'activité GS maximale apparaît 3 jours après l'activité NR maximale.

CAMPBELL *et al* (1984) décrivent, dans des suspensions cellulaires autotrophes de *Chenopodium rubrum*, une évolution différente des deux enzymes : la nitratre réductase montre un pic d'activité lors de la phase exponentielle, alors que l'activité GS croît régulièrement jusqu'à la fin de la culture.

LOYOLA-VARGAS & SANCHEZ DE JIMENEZ (1986) montrent, dans des cultures de cals de maïs en nutrition azotée mixte (NO_3 40 mM + NH_4 20 mM), une augmentation très nette (x3) de l'activité GS lors de la phase exponentielle de croissance.

BRASSART *et al.* (1984) montrent, sur une suspension cellulaire hétérotrophe de *Silene alba*, que l'activité GS varie en fonction de la nature de l'élément azoté disponible dans le milieu (nitratre, glutamine ou ammonium). Ces auteurs montrent, en présence d'ammonium, un maximum d'activité GS à la fin de la phase de croissance exponentielle des cellules, ce qui vient confirmer nos résultats.

- Influence du fonctionnement plastidial :

Nous avons pu mettre en évidence une activité GS maximale 4 fois plus importante dans les cultures d'*Abrus* photomixotrophes. Or, il est maintenant clairement établi que la GS peut exister sous deux formes principales: l'une cytosolique (GS1), l'autre chloroplastique (GS2) (HIREL & GADAL - 1980).

Le fonctionnement de l'isoforme GS₂, dans les cultures chlorophylliennes, pourrait expliquer en partie l'activité GS plus importante mesurée sur ce matériel.

	Suspension hétérotrophe en fioles	Suspension photomixotrophe en fioles
Nucléotides Adényliques totaux (ADP + ATP) à l'inoculation (nanomoles.g ⁻¹ MS)	100	1100
Nucléotides Adényliques totaux (ADP + ATP) maximum (nanomoles.g ⁻¹ MS)	1200	16000
Facteur de multiplication des nucléotides totaux	x 12	x1,5
ATP à l'inoculation (nanomoles.g ⁻¹ MS)	60	20
ATP maximum (nanomoles.g ⁻¹ MS)	1125	95
Facteur de multiplication pour l'ATP	x 19	x 5
Activité Glutamine Synthétase (μ mol. GH.h ⁻¹ mg ⁻¹ prot.)	1,15	4,2

Tableau n° 11 : Comparaison de l'activité glutamine synthétase maximale
et du taux en nucléotides adényliques totaux et en ATP

Par test immunoenzymatique de type Ouchterlony, il est possible de montrer la présence de l'isoforme chloroplastique de la GS, à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre la forme GS2 (HIREL -1984).

L'utilisation d'un antisérum anti-GS 2 foliaire de tabac (mis à notre disposition par le Dr B. HIREL - CNRS/INRA Versailles) nous permettra de confronter clairement cette hypothèse.

Dans les cultures cellulaires hétérotrophes strictes, une seule isoforme de la GS est présente (BRASSART *et al.* - 1984). Cette donnée s'ajoute à celles déjà obtenues sur d'autres matériels non photosynthétiques (SUZUKI *et al.* - 1981; HIREL *et al.* - 1984)

- Relations avec le taux en adénylates :

Les activités GS et GDH sont sous le contrôle du métabolisme des sucres, *via* les variations de la teneur en nucléotides réduits et en ATP (WEISSMANN; 1972 a & b). L'activité GS semble en particulier être très sensible aux variations de la charge énergétique cellulaire (WEISSMAN - 1976; SAHULKA & LISA - 1978; OAKS *et al.* - 1980).

Sur notre matériel végétal, HARDY-CLARIS (1988) a dosé les nucléotides adényliques présents dans les différents types de culture (voir Annexe D).

Le tableau n° 11 permet, à partir de ces résultats, de mettre en relation l'activité de synthèse en adénylates totaux (ADP+ATP) et en ATP avec l'activité Glutamine Synthétase dans les cultures cellulaires d'*Abrus*, hétérotrophes ou photomixotrophes.

A la lecture de ce tableau, il n'apparaît pas de corrélation directe entre la charge en nucléotides adényliques ou en ATP, et l'activité GS maximale.

Il semble donc qu'un autre facteur déterminant soit à rechercher afin d'expliquer l'importante différence d'activité GS mesurée entre les suspensions hétérotrophes et photomixotrophes.

- Relations avec la nutrition ammoniacale :

Si l'on compare l'activité maximale GS, pour les deux types de cultures étudiées, avec la vitesse moyenne de consommation de l'ammonium, on remarque que ces deux données sont corrélées positivement. En effet, la VMC pour l'ammonium est de 4,4 $\mu\text{moles NH}_4 \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{PMF}$ dans les suspensions hétérotrophes en fioles, et de 6,6 $\mu\text{moles NH}_4 \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{PMF}$ dans les suspensions photomixotrophes.

Il est donc possible, à partir de nos résultats, de relier la plus forte activité GS mesurée dans les cellules photomixotrophes à une meilleure absorption de l'ammonium.

L'incorporation de l'ammonium fait appel à une succession de systèmes enzymatiques étroitement liés entre eux par des régulations complexes (voir Fig ??? p: ???) . Même si la voie GS/GOGAT est considérée comme prédominante chez les végétaux supérieurs, l'ion NH_4 peut également être incorporé *via* la GDH, si les conditions physiologiques de la cellule sont modifiées (LEA & MIFLIN - 1976).

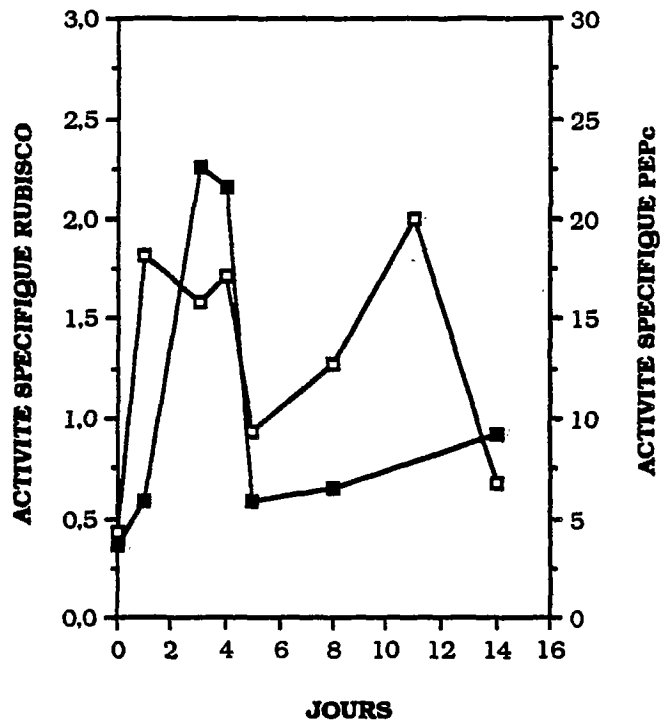
Nous avons pu mettre en évidence une activité GDH dans les cultures cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes d'*Abrus precatorius*, par révélation colorimétrique après électrophorèse en gel d'amidon (voir le Chapitre Résultats & Discussions, § E-2).

L'étude d'une seule de ces enzymes, la GS, est évidemment insuffisante pour pouvoir aborder le problème de l'assimilation de l'ammonium dans sa globalité.

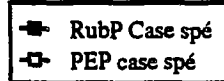
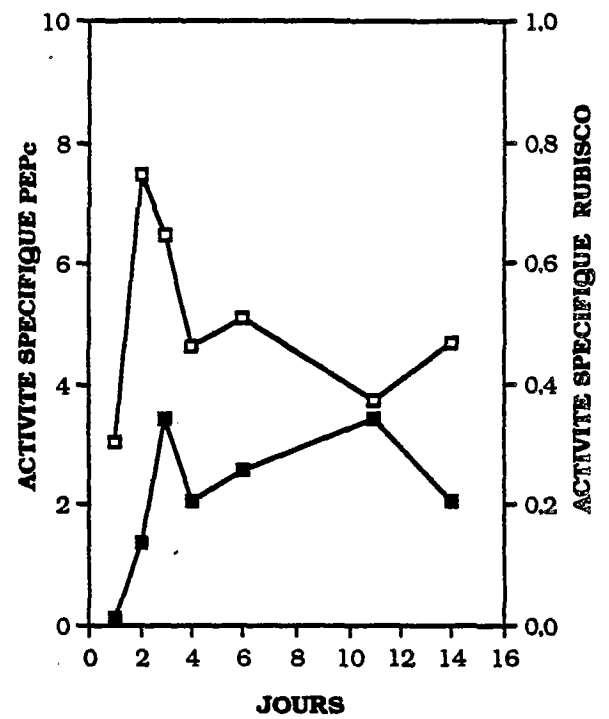
Au cours de notre étude, de nombreux paramètres physiologiques et biochimiques ont été étudiés : la taille restreinte des prélèvements de biomasse, notamment sur les

EVOLUTION DES ACTIVITES CARBOXYLASES

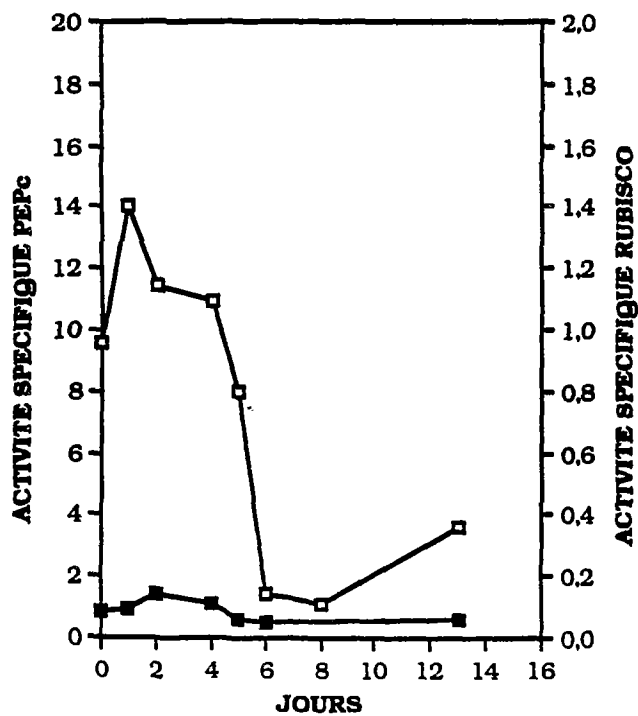
Suspension hétérotrophe en fioles

**EVOLUTION DES ACTIVITES CARBOXYLASES**

Suspension photomixotrophe en fioles

**EVOLUTION DES ACTIVITES CARBOXYLASES**

Suspension hétérotrophe en bioréacteur

**EVOLUTION DES ACTIVITES CARBOXYLASES**

Suspension photomixotrophe en bioréacteur

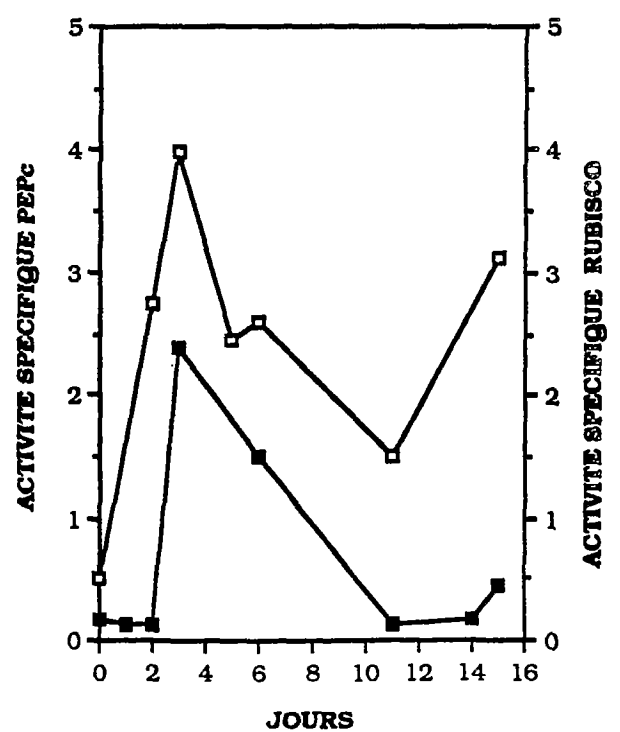


Figure n° 57 : Evolution comparée des activités carboxylases : Rubisco & PEPc.

bioréacteurs, ne nous permet malheureusement pas d'envisager d'autres dosages enzymatiques. Le temps forcément limité accordé à ce travail a été insuffisant pour adapter et exploiter d'autres dosages, tels que les activités GOGAT, GDH ou GOT.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude cinétique conjointe de l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans l'incorporation de l'ammonium dans des suspensions cellulaires.

Ainsi, BRASSART *et al.* (1984) ont étudié l'évolution des activités GS et GDH dans des cultures cellulaires de *Silene alba*. Il apparaît clairement dans cette étude une différence importante dans la cinétique de l'activité des deux enzymes : L'activité GS varie en fonction de la croissance cellulaire, alors que celle de la GDH reste stable. Les auteurs confirment ainsi le fonctionnement préférentiel de la voie GS-GOGAT dans des suspensions cellulaires hétérotrophes.

A l'inverse, MURILLO & SANCHEZ DE JIMENEZ (1984) montrent sur des suspensions cellulaires de *Bougardia ternifolia*, que les deux voies d'assimilation sont fonctionnelles. Pour ces auteurs, l'assimilation de l'ammonium *via* l'une ou l'autre de ces voies dépend de la nature du tissu (cellules issues de feuilles ou de racines), de la source d'azote, et de la phase de croissance considérées.

3) Les carboxylases : Rubisco & PEP Case :

a) Etude de l'évolution des activités carboxylases dans des cultures hétéro-et mixotrophes en fioles ou en bioréacteur : (Fig. n° 57)

Le but de cette étude est de mettre en évidence l'évolution en cours de culture des activités des deux enzymes impliquées dans la fixation primitive du CO₂: PEPc et Rubisco.

Elle doit en outre nous permettre de caractériser plus complètement les états d'hétéro et de photomixotrophie.

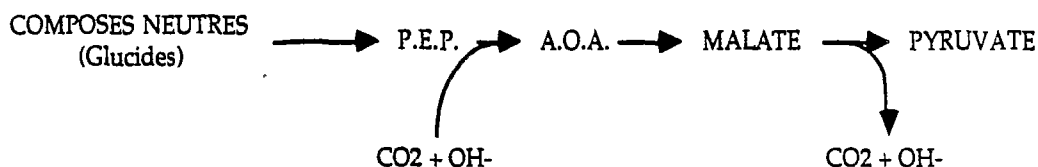
1) Evolution de l'activité PEP Carboxylase :

Dans les quatre types de cultures considérés, l'activité PEPc subit une forte augmentation en début de phase exponentielle.

Ce pic d'activité est très marqué dans les cellules photomixotrophes cultivées en bioréacteur, où l'activité spécifique PEPc est multipliée par 8 durant les quatre premiers jours de la culture. Cette augmentation est par contre très faible dans la culture hétérotrophe en bioréacteur.

NATO *et al* (1981-a) montrent, dans les cultures cellulaires de Tabac, une augmentation nette de l'activité PEPc en début de culture, corrélée avec une augmentation transitoire de l'activité respiratoire. La stimulation de l'activité PEPc durant la phase exponentielle de croissance a été souvent mise en évidence dans les cultures *in vitro* de cellules végétales (NISHIDA *et al.* - 1980, HUSEMANN - 1981).

Pour plusieurs auteurs, cette stimulation de la PEPc est interprétée comme une adaptation des cellules afin de maintenir constant le pH cytoplasmique. DAVIES (1973-1979) implique la PEPc, en association avec la malate déshydrogénase et l'enzyme malique dans la régulation des flux d'ions, suivant le schéma suivant (fonction pH-Stat biochimique) :



Pour tous les types de cellules étudiées, l'activité PEPc est minimale en fin de phase de croissance exponentielle. Elle remonte ensuite en fin de culture, avec un pic très marqué dans les cellules hétérotrophes en fioles, où la PEPc retrouve alors le niveau d'activité maximal mesuré en cours de phase exponentielle.

NATO (1984) étudie le mécanisme d'apparition de ce pic d'activité PEPc sur des cultures cellulaires de Tabac jeunes (5 jours) ou matures (21 jours). Par superposition des courbes d'immunotitration, l'auteur montre que les cellules jeunes contiennent une plus grande quantité d'enzymes que les cellules matures.

La stimulation de l'activité PEPc dans les cellules en prolifération n'est donc pas un phénomène de régulation post-traductionnelle (activation), mais concerne bien une synthèse *de novo* de molécules de la carboxylase. Il en résulte donc un enrichissement de l'enzyme dans le pool total des protéines solubles.

Pour NATO & MATHIEU (1978), ce pic transitoire d'activité PEPc permet de limiter la déperdition du carbone sous sa forme CO_2 , au moment où les composés carbonés ne sont pas incorporés *via* le cycle tricarboxylique, alors que la respiration est intense.

Les valeurs maximales d'activité PEPc varient d'un type de culture à l'autre; la plus haute valeur mesurée concerne les suspensions hétérotrophes en fioles : elle atteint alors $23 \mu\text{moles CO}_2 \text{ fixées.h}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ prot}$. Par contre, cette valeur maximale n'atteint que $4 \mu\text{moles CO}_2 \text{ fixées.h}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ prot}$ dans les suspensions photomixotrophes en bioréacteur.

D'une manière générale, il est intéressant de remarquer que:

- d'une part, les cellules hétérotrophes présentent une activité spécifique PEPc toujours plus importante que les cellules photomixotrophes.
- d'autre part, le niveau d'activité est toujours plus faible en bioréacteur aéré qu'en fioles fermées. Les modifications des conditions d'agitation, de l'environnement gazeux, semblent avoir une influence importante sur l'activité PEPc.

La valeur de l'activité PEPc mesurée dans les cultures hétérotrophes en fioles semble remarquablement élevée si on la compare à celles mesurées sur d'autres suspensions cellulaires : $7 \mu\text{moles CO}_2 \text{ fixées.h}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ prot}$ pour des cellules de tabac photomixotrophes ; 5,84 pour des cellules de tabac autotrophes (NATO & VIDAL -1983).

2) Evolution de l'activité Rubisco : (Figure n° 57)

Quel que soit le type de culture considéré, on note une augmentation d'activité Rubisco au 4^e jour de culture. Ce "pic" d'activité est visualisable surtout dans les suspensions photomixotrophes en bioréacteur, où l'activité spécifique Rubisco atteint $2,5 \mu\text{moles CO}_2 \text{ fixées.h}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ prot}$ lors de la phase exponentielle de croissance, alors que l'activité n'est pas mesurable à l'ensemencement.

NATO & MATHIEU (1978) décrivent sur des cultures photomixotrophes de tabac, une évolution des activités PEPc et Rubisco concomitantes, avec une augmentation à peine mesurable de l'activité Rubisco lors de la phase exponentielle.

L'activité Rubisco n'est pas décelable dans les suspensions hétérotrophes en bioréacteur. Par contre, sur ce même type de cellules cultivées en fiole d'Erlenmeyer, l'activité Rubisco est importante; elle atteint un niveau équivalent à celui mesuré pour les suspensions mixotrophes.

Ce résultat va, pour le moins, à l'encontre des données établies concernant le rôle de la Rubisco dans la fixation photosynthétique du CO₂; nous décrivons ici un système hétérotrophe possédant une activité Rubisco comparable à celle mesurée sur le même matériel en conditions de mixotrophie (taux en saccharose réduit, présence de lumière).

Il importe de préciser que nous avons estimé, pour ces deux carboxylases, une activité *in vitro*, c'est-à-dire l'expression d'une activité potentielle, dans des conditions optimales. Les tests de détection immunoenzymologiques (tests de MANCINI) nous ont permis par ailleurs de montrer que la Rubisco est présente dans les cellules hétérotrophes, et ce quel que soit l'âge des cellules.

Dans les cellules hétérotrophes d'*Abrus precatorius*, on détecte donc une enzyme parfaitement fonctionnelle. Des mesures de fixation *in vivo* de ¹⁴CO₂ et l'identification des produits de la fixation, réalisés sur des cellules entières, permettront sans doute de donner la mesure réelle de cette activité (NATO & VIDAL - 1983).

D'autre part, il importe de rappeler que les cultures cellulaires hétérotrophes décrites ici proviennent de lignées chlorophylliennes photomixotrophes placées à l'obscurité dans un milieu plus riche en saccharose. Il ne s'agit pas de mutants dépourvus d'activité Rubisco, dans le sens présenté par NATO *et al.* (1984). Les cellules sont rendues hétérotrophes par cette modification des conditions de culture, mais elles conservent, selon toute vraisemblance, leur capacité de biosynthèse pour les enzymes impliquées dans la fixation photosynthétique du carbone. L'activité photosynthétique et le verdissement des cellules sont restaurés après un mois de culture à la lumière, dans un milieu appauvri en saccharose (15 g.l⁻¹).

Dans nos cultures cellulaires, le rapport PEPc/Rubisco est très important : il est toujours compris entre 10 et 20 durant la phase exponentielle de croissance. Ce rapport élevé est caractéristique d'une fixation préférentielle du CO₂ par voie non photosynthétique. Dans nos deux types de cultures photomixotrophes *in vitro*, contrairement à ce qui existe dans la plante entière, la Rubisco n'apparaît jamais comme l'enzyme de carboxylation prépondérante. NATO & MATHIEU (1978) décrivent une situation semblable dans des cultures photomixotrophes de tabac : durant la phase exponentielle, le rapport PEPc/Rubisco est voisin de 7.

Chez les cultures photomixotrophes d'*Abrus* en bioréacteur, le rapport PEPc/Rubisco est de 1,6 environ, et reste quasiment constant jusqu'au 11^e jour de culture. En fin de cycle (11 à 15 jour) la fixation du CO₂ semble préférentiellement assurée par la PEPc.

Même si une capacité photosynthétique nette a pu être mise en évidence sur notre matériel, l'équipement enzymatique en Rubisco apparaît encore nettement insuffisant pour assurer une croissance à proprement parler photomixotrophe.

I. HARDY -CLARIS (1988) a pu montrer, lors de cultures en atmosphère enrichie en CO₂, l'incapacité de cette lignée à maintenir une croissance en autotrophie stricte.

NATO (1984) compare le rapport PEPc/Rubisco de cellules de Tabac cultivées en conditions de mixotrophie (milieu à 30g.l⁻¹ de saccharose) ou de photoautotrophie (milieu sans sucres et atmosphère enrichie en CO₂ à 4%). Les rapports maximaux observés sont de 2,73 pour les cellules mixotrophes, et de 1,10 pour les cellules autotrophes.

Etudiant l'incorporation de ¹⁴CO₂ par des suspensions autotrophes de *Cytisus scoparius* et de *Nicotiana tabacum*, SATO et al. (1980) montrent que ces cultures fixent préférentiellement le ¹⁴C sur les acides organiques en C4 (malate).

L'étude conjointe des activités carboxylasiques suggère que les cultures cellulaires photomixotrophes de plantes en C3 peuvent, à l'instar des organes végétaux en début d'ontogénèse, montrer une voie de fixation du CO₂ de type C4, via la PEPc (NATO & MATHIEU -1978).

- Relations avec l'activité respiratoire :

Dans les quatre types de cellules étudiées, l'augmentation nette de l'activité PEPc spécifique a lieu lorsque, à la fois, l'énergie cellulaire et la demande en chaînes carbonées pour la synthèse des protéines sont importantes.

Ce résultat confirme les interprétations de NATO (1984) concernant des cellules photomixotrophes de tabac.

- Relations avec la nutrition carbonée :

SATO et al. (1980) suggèrent que le PEP indispensable à la PEPcarboxylase est fourni durant la phase exponentielle par la glycolyse. En effet, pour de nombreuses cultures cellulaires, cette période correspond à une activité d'hydrolyse de saccharose disponible, d'accumulation de glucides dans la cellule, et de respiration mitochondriale active.

Les cultures cellulaires photomixotrophes d'*Abrus precatorius* présentent donc un comportement strictement hétérotrophe en début de culture.

En fin de cycle, alors que les réserves en sucres sont très faibles ou nulles, la chlorophyllogénèse redevient active dans les cultures photomixotrophes. Il semble que les deux activités carboxylases augmentent alors légèrement. (Le dosage de Rubisco réalisé au 14^e jour dans la culture en fioles ne suit pas l'évolution générale, qui montre une augmentation régulière de l'activité Rubisco à partir du 4^e jour, ce point est à considérer avec prudence).

Ce résultat va dans le sens de l'établissement d'un état de photoautotrophie instable en fin de culture dans des cellules photomixotrophes. Il confirme les données présentées par un grand nombre d'auteurs (HARDY - 1984; NATO - 1984;...).

- Relations avec le nucléotides pyridiniques: (voir Annexe D)

Le pic d'activité PEPc, situé pour toutes nos cultures durant la phase exponentielle, correspond bien à une phase de néosynthèse de nucléotides pyridiques (HARDY-CLARIS - 1988).

Sur notre matériel, le NADH résiduel représente, pour cette même période, 20% seulement des nucléotides totaux (HARDY-CLARIS - 1988).

Le NADH a donc été l'objet d'une consommation intense par plusieurs systèmes enzymatiques induits durant la phase exponentielle (nitrate réductase, PEP case).

WESTERN BLOTS RubP Case. (IgG Anti RubP maïs)

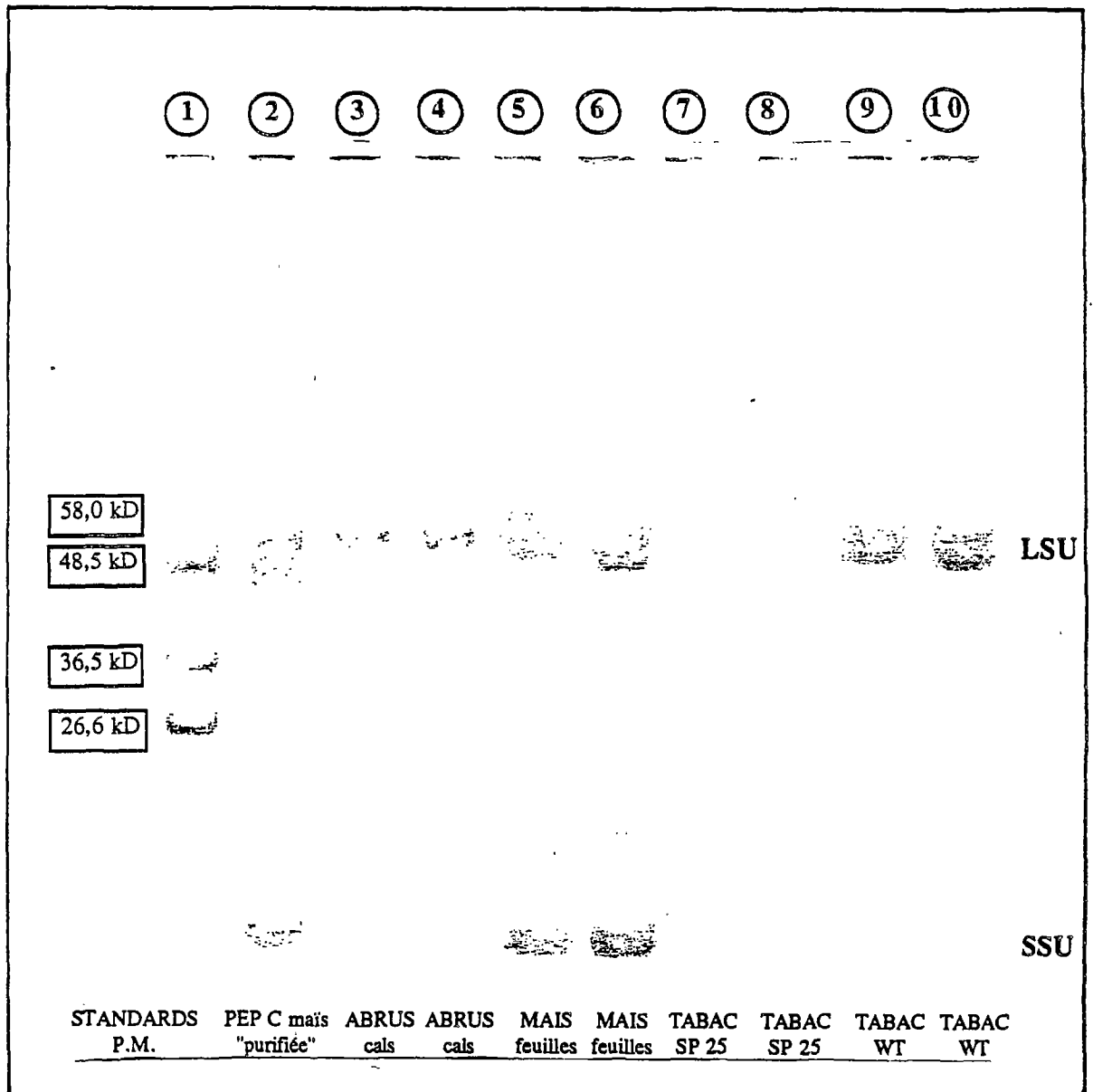


Figure n° 58 : Immunoempreintes pour la Rubisco . (IgG anti Rubisco de maïs)

b) Caractérisation immunoenzymologique:

1) Extraction de la Rubisco:

- à partir de feuilles de plantules ou de microboutures (maïs, tabac, *Abrus*):

500 mg de feuilles sont broyées à froid à l'aide d'un mortier et d'un pilon, en présence du tampon d'extraction (4 ml.g⁻¹M.F.). Le broyat est ensuite homogénéisé à la presse de French (1000 psi - 2 passages). Le surnageant obtenu après centrifugation (4°C - 30 000 g- 15 min.) constitue l'extrait enzymatique brut.

- à partir de cals de prolifération (*Abrus*):

2 à 3 grammes (M.F.) de cals sont broyées par deux passages successifs à la presse de French (1000 psi), en présence de 1 ml de tampon d'extraction par gramme de matière fraîche. Le broyat est ensuite centrifugé à 4°C dans une centrifugeuse de table de type Microfuge (30 000g - 15 minutes). Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut, qui est ensuite prépurifié et concentré 5 fois par précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation.

- à partir de suspensions cellulaires:

Le protocole d'extraction est identique à celui utilisé pour les cals, mais l'extrait brut est concentré 10 fois.

La teneur en protéines des extraits concentrés est de 10 µg.ml⁻¹ de protéines solubles pour les extraits de cals et de cultures cellulaires, et de 3 µg.ml⁻¹ pour les extraits foliaires.

2) Immunoempreintes ou Immunoblotting:

Afin de mettre en évidence une éventuelle reconnaissance immunologique de la Rubisco extraite de cals chlorophylliens d'*Abrus precatorius* (lignée 6H), nous avons utilisé un antisérum de lapin Anti-Rubisco de plantules de Maïs (AC3 : LSMP-ORSAY).

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure n° 58. Les échantillons à analyser ont été déposés dans l'ordre suivant:

Piste n°1: Marqueurs standards de poids moléculaire: de 26,6 à 58,0 kD

Piste n°2: L'immunoblotting permet de révéler la présence de contaminants dans un extrait "purifié" de PEP Carboxylase. Le contaminant est indiscutablement de la RubP Carboxylase, présentant, après dénaturation, ses deux sous-unités caractéristiques: une petite sous-unité (SSU), de poids moléculaire voisin de 12 kD, et une grande sous-unité (LSU), de P.M.= 55 kD. Il est important de noter que la présence de Rubisco contaminante était indécélable après une révélation classique du gel au Bleu de Coomassie. On n'obtient alors qu'une seule bande correspondant au poids moléculaire des monomères de la PEP Case (100 kd).

Pistes n°3 & 4: Sur un extrait brut de cals chlorophylliens d'*Abrus precatorius*, on décèle seulement la présence de la grande sous-unité (LSU). La non-reconnaissance, par les IgG "Anti-Maïs", de la petite sous-unité peut s'expliquer par la faible taille de ce monomère (12 kD), et par conséquent, son faible nombre de sites antigéniques (deux, environ); la probabilité de reconnaissance par un anticorps se trouve donc proportionnellement réduite (HOARAU: communication personnelle).

Pistes n°5 & 6: Sur des extraits foliaires de *Zea mays*, la reconnaissance des deux sous-unités est parfaite; l'Anticorps testé est d'une pureté satisfaisante: on ne note pas de bandes parasites, qui seraient dues à la présence, dans le sérum, d'autres anticorps qu'Anti-Rubisco.

Nota: La monospécificité d'un antisérum doit toujours être vérifiée avec des

extraits enzymatiques bruts, non purifiés, qui renferment donc un spectre en protéines large, capable de révéler le plus grand nombre possible de contaminants éventuels.

Pistes n° 7 & 8: Des extraits de cultures cellulaires *in vitro* de *Nicotiana tabacum*, mutant Techné SP25, (NATO et al. - 1984) ne montrent aucune trace de Rubisco. On vérifie ainsi les caractéristiques enzymologiques de ces mutants de tabac non photosynthétisants.

Pistes n° 9 & 10: Sur le génotype sauvage (Wild Type : WT) de suspensions cellulaires photosynthétisantes de *Nicotiana tabacum*, seule la grande sous-unité, moins variable, est reconnue par les anticorps.

Conclusions:

L'antisérum utilisé (dressé contre la Rubisco de *Zea mays*) a permis de révéler la sous-unité 55 kD sur trois espèces végétales très différentes: *Zea mays*, *Nicotiana tabacum* et *Abrus precatorius*. Ces trois espèces présentent pour ce système enzymatique une parenté immunologique certaine, malgré des voies de fixation du CO₂ différentes: métabolisme en C₄ (maïs) ou en C₃ (tabac, *Abrus*).

La révélation de l'immunoblotting ne présente quasiment pas de bandes parasites. L'antisérum utilisé possède donc une spécificité satisfaisante pour la Rubisco.

Des tests complémentaires d'immunodiffusion et d'immunoprécipitation pourront donc être mis en place, pour notre matériel végétal, à l'aide de ces anticorps anti-Rubisco de maïs.

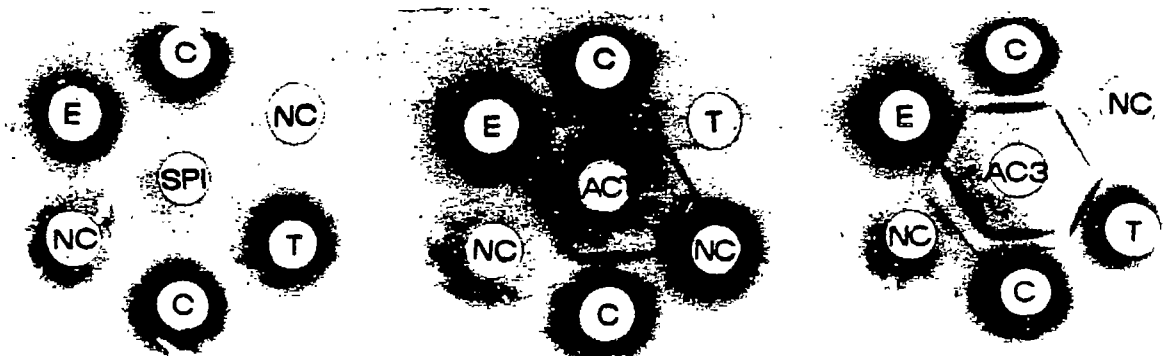
3) Tests d'immunodiffusion en gels: Ouchterlony & Mancini.

TESTS D'OUCHTERLONY:

Ces tests ont pour but de confirmer, par une autre technique que les immunoempreintes, la reconnaissance de la Rubisco, extraite de notre matériel végétal (feuilles, cals & suspensions cellulaires d'*Abrus*) par diverses préparations d'IgG.

Nous chercherons ensuite à mettre en évidence d'éventuelles parentés immunologiques par des tests de reconnaissances croisées.

- TEST n° 1 : Ce test est réalisé afin de comparer deux extraits enzymatiques provenant de cals d'*Abrus precatorius*, chlorophylliens (C.) et non-chlorophylliens (N.C.), âgés de 25 jours environ. Il permet également de comparer le comportement de deux antisérums (ACT et AC3) anti-Rubisco de tabac (ACT) ou de maïs (AC3), face aux mêmes antigènes.



LEGENDE: SPI: Sérum Pré-Immun
 ACT: Anti-Corps IgG tabac
 AC3: Anti-Corps IgG maïs (3° saignée)

E: solution standard de
 RudiPCase pure (épinard)
 T: cultures cellulaires de Tabac (WT)
 C: cals d'*Abrus* Chlorophylliens
 N.C.: cals d'*Abrus* Non
 Chlorophylliens

Résultats & interprétations:

A Le témoin réalisé avec du sérum pré-immun ne présente aucun arc de précipitation parasite.

B: On obtient, avec les anticorps anti-tabac (ACT), des arcs parfaitement jointifs pour les extraits C, NC et E. La RubP Case présente donc des formes immunologiquement semblables dans les trois extraits. Avec l'extrait cellulaire de tabac T, les arcs sont disjoints, montrant une parenté seulement partielle entre cette forme de l'enzyme et celle provenant des trois autres extraits testés.

C: Avec des anticorps anti-maïs (AC3), les arcs obtenus avec les extraits C et NC sont tous dédoublés. L'un des deux arcs, le plus proche des puits périphériques, correspond parfaitement à la RubPCase-étalon; il est présent pour tous les extraits (C, NC, T), de manière moins visible pour l'extrait NC. Les extraits E et T semblent présenter des propriétés antigéniques communes. Le deuxième arc, plus proche du puits central, se rencontre pour tous les extraits d'*Abrus*. Ce deuxième arc de précipitation ne peut pas être attribué à un défaut de pureté de la préparation d'IgG anti-Rubisco de Maïs utilisée pour ce test. En effet, la monospécificité de cette solution d'anticorps a été vérifiée par immunoempreintes. (figure n° ??, p: ???); Il pourrait s'agir, par contre, de formes dégradées de la Rubisco présentant encore des sites de reconnaissance antigéniques actifs.

- TEST n° 2: Comparaison entre anticorps anti-Tabac ACT et anticorps anti Maïs AC2



LEGENDE: C: cals d'*Abrus* Chlorophylliens
 NC: cals d'*Abrus* Non Chlorophylliens
 E: solution standard de RudiPCase
 pure d'Épinard

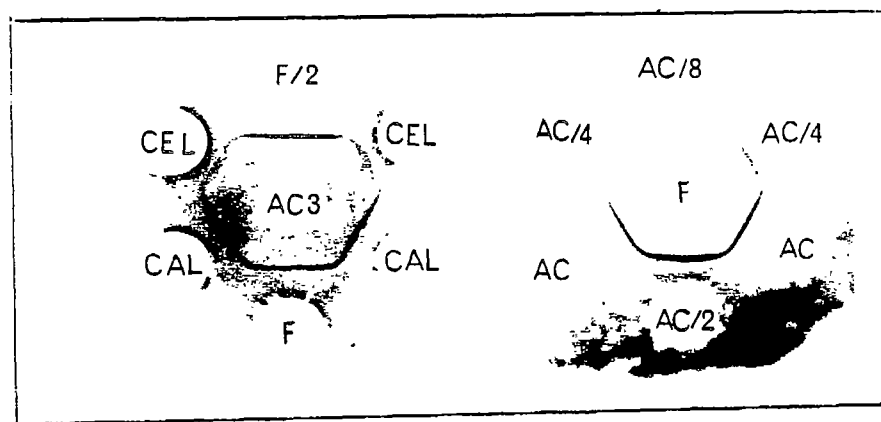
T: cultures cellulaires de Tabac (WT)
 ACT: Anti-Corps IgG tabac
 AC2: Anti-Corps IgG maïs Lapin.
 (2° saignée)

Résultats & interprétations:

A. On retrouve les arcs de précipitation obtenus précédemment pour le même test.

B. Les arcs obtenus avec l'anticorps AC2 sont semblables à ceux obtenus avec AC3: ils sont dédoublés pour tous les extraits d'*Abrus* (C et NC). Ici, contrairement à AC3, c'est l'arc le plus intérieur qui correspond à l'enzyme purifiée E et à l'extrait de Tabac T. Les extraits d'*Abrus* C et NC présentent un arc extérieur.

TEST n° 3: Comparaison des caractéristiques immunoenzymologiques de la Rubisco extraite de cals, de cultures cellulaires chlorophylliennes, et de feuilles d'*Abrus precatorius*. Ce test nous a permis de plus, comparer l'effet de diverses concentrations en anticorps AC3 sur l'immunoprécipitation du même extrait (Feuilles).



LEGENDE: CAL: cals d'*Abrus* chlorophylliens
 CEL: cellules d'*Abrus* chlorophylliennes
 F: feuilles d'*Abrus*

AC3: Anti-Corps IgG maïs Lapin.
 (3° saignée)
 AC/x: AC3 dilué x fois

Résultats & interprétations:

A: Les arcs obtenus avec l'anticorps AC3 sont parfaitement jointifs pour tous les extraits (CAL, CEL, F). Il n'existe donc pas de différences immunologiquement détectables entre la Rubisco extraite de feuilles d'*Abrus* et de lignées statiques ou cellulaires chlorophylliennes. La mise en culture *in vitro* n'induit donc pas de différences morphologiques sur la Rubisco, et l'équipement enzymatique indispensable à la photosynthèse n'est donc pas altéré et reste fonctionnel.

B: L'anticorps AC3 est utilisé à différentes concentrations: les dilutions vont de 2 à 8 fois (AC/2 à AC/8). On obtient des arcs jointifs, avec une densité de coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps mis en présence. La netteté maximale est obtenue avec des solutions d'IgG pures ou diluées deux fois.

- **TEST n° 4:** Effet du mode de conservation des extraits bruts sur l'intégrité de la molécule de Rubisco. Ce test permet de comparer deux extraits de feuilles d'*Abrus*: l'un d'entre eux est déposé immédiatement après extraction (AF1), l'autre est conservé durant 15 heures à 4°C (AF2). Une solution de Rubisco purifiée d'épinard (E) ayant subi un cycle congélation/décongélation (-30°C) est déposée. Les solutions antigéniques sont

testés contre des anticorps AC3. Le résultat est présenté sur la figure n° 59.

LEGENDE: AF1: feuilles d'*Abrus* (extemporané) AC3: Anti-Corps IgG maïs Lapin.
 AF2: feuilles d'*Abrus* (15h à 4°C) (3°saignée)
 E : solution standard Rubisco
 (congelée/décongelée)

Résultats & interprétations:

La conservation des extraits cellulaires à 4°C n'affecte apparemment pas l'antigénicité de la Rubisco: l'enzyme reste clairement détectable. De plus, les arcs d'immunoprécipitation obtenus sont parfaitement jointifs: la structure quaternaire est donc en partie maintenue. Par contre, après congélation/décongélation de la solution étalon de Rubisco pure d'Epinard, aucun arc n'est visible: l'enzyme est totalement dénaturée. Les extraits enzymatiques devront par conséquent être dosés extemporanément, ou conservés à 4°C.

- **TEST n° 5 :** Détection de la Rubisco dans des suspensions cellulaires d'*Abrus* hétérotrophes & photomixotrophes cultivées en Erlenmeyer. La préparation AC3 est testée contre des extraits issus de prélèvements à des dates différentes sur une même culture hétérotrophe (H0 à H11) ou mixotrophe (M0 à M14). L'indice représente l'âge de la culture en jours.

Le résultat obtenu est présenté sur la figure n° 60

LEGENDE: H0 à H11: Cellules hétérotrophes AC3: Anti-Corps IgG maïs Lapin.
 M0 à M14: Cellules photomixotrophes (3°saignée)

Résultats & interprétations:

A: Dans les cultures hétérotrophes, les arcs d'immunoprécipitation sont visibles quel que soit l'âge des cellules: l'enzyme est donc présente tout au long de la culture: La Rubisco semble donc être constitutive, tout au moins en partie, car elle est détectable dans des extraits inactifs.

Il est intéressant de noter que les arcs sont dédoublés pour les prélèvements correspondant aux périodes de plus forte activité (3, 4 et 6 jours). Ces résultats confirment nos observations réalisées avec l'anticorps AC3 sur les cals chlorophylliens. En effet, ces cals chlorophylliens âgés de 10 jours présentaient une activité Rubisco non négligeable ($0,68 \mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot.}$).

Il est possible que la préparation polyclonale AC3 reconnaisse une forme intermédiaire de Rubisco, décelable uniquement lors des périodes de néosynthèse active de l'enzyme (phase exponentielle de croissance de la suspension).

B: Dans les cultures photomixotrophes, la Rubisco suit sensiblement la même évolution: tous les arcs d'immunoprécipitations restent jointifs, et se dédoublent pour les extraits correspondant aux cellules âgées de 3, 4 et 6 jours. Ces dates correspondent, pour cette culture, aux périodes de plus grande activité Rubisco.

TEST n° 6: Comparaison entre propriétés immunologiques de la Rubisco extraite de diverses lignées cellulaires de plantes médicinales isolées et entretenues au Laboratoire de Physiologie & Biotechnologie Végétales du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

Ce test est effectué sur des lignées cellulaires photomixotrophes et des feuilles de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) et de *Tephrosia vogelii* Hook f. (Leguminosae).

Il nous permet de vérifier la réactivité de la préparation AC3 face à des

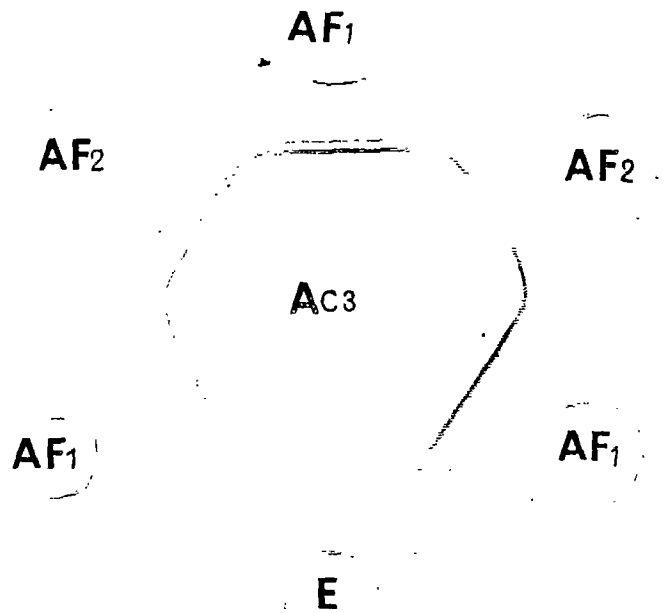


Figure n° 59 : Effet du mode de conservation de la Rubisco sur l'intégrité de la molécule

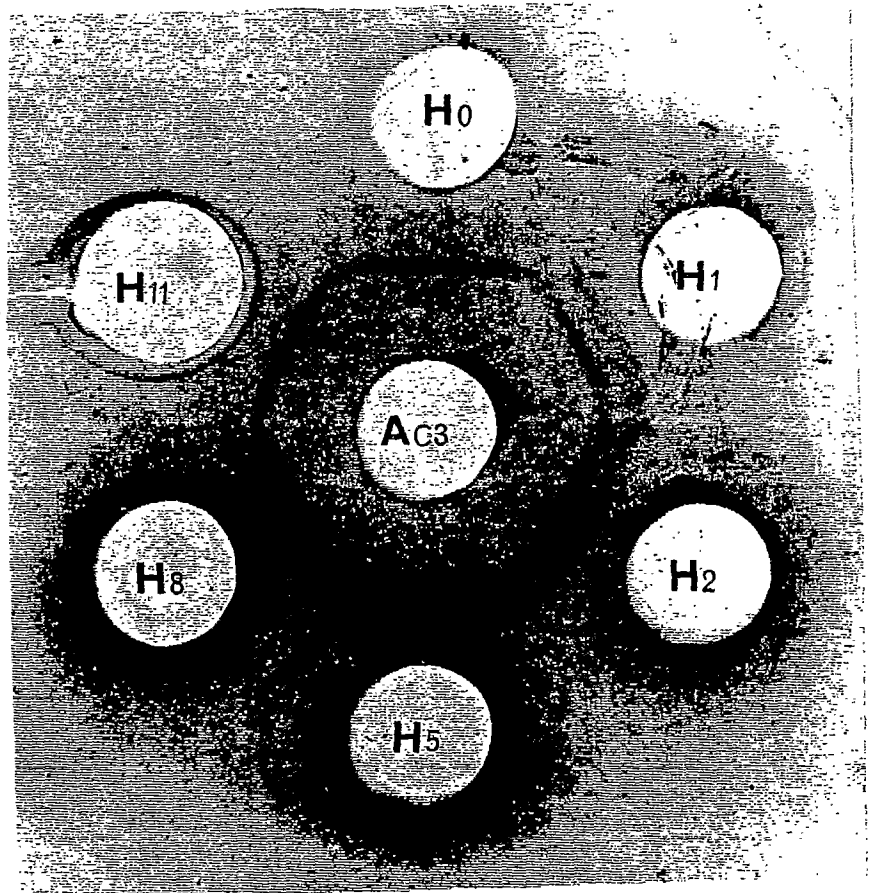


Figure n° 60 : Détection de la Rubisco dans des suspensions cellulaires d'*Abrus* hétérotrophes

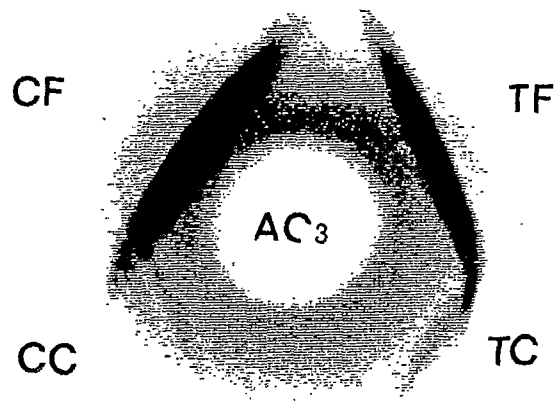
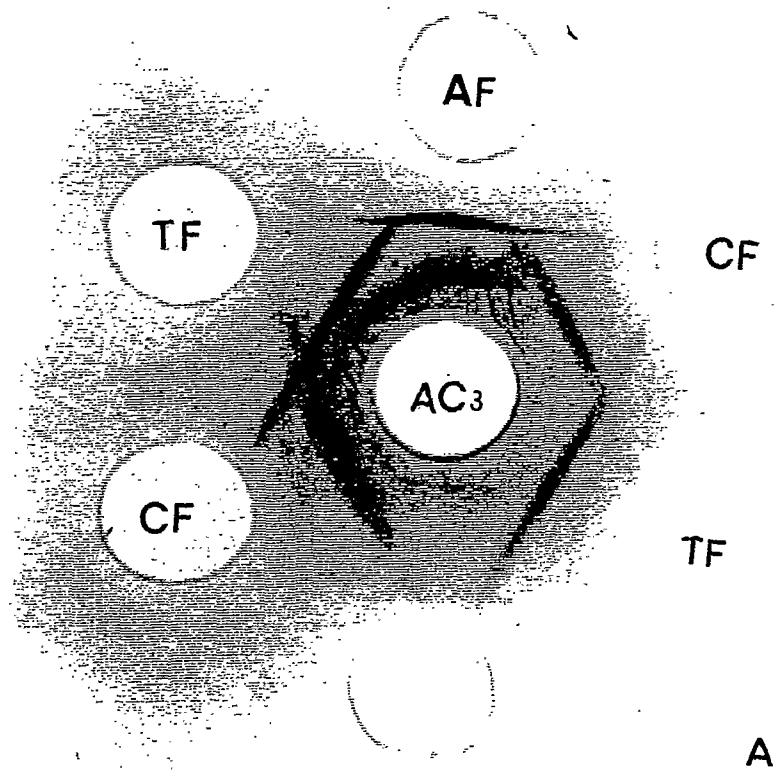


Figure n° 61 : Comparaison entre propriétés immunologiques de la Rubisco extraite de feuilles et de lignées cellulaires de diverses plantes médicinales.
A = feuilles ; B = cellules et feuilles

enzymes extraites de plantes appartenant ou non à la même famille botanique. Ce test constituait un préliminaire indispensable à l'utilisation des anticorps anti Rubisco disponibles au LSMP Orsay sur le matériel végétal installé au Laboratoire.

Les lignées cellulaires nous ont été aimablement fournies par Claudine NEF (*Catharanthus*) et Nadine LAMBERT (*Tephrosia*).

Ce résultat est présenté à la figure n° 61.

LEGENDE: TF: *Tephrosia* feuilles TC: *Tephrosia* cellules AC3 : IgG anti RubP maïs Lapin.
 CF: *Catharanthus* feuilles CC: *Catharanthus* cellules (3°saignée)
 AF: *Abrus* feuilles AC : *Abrus* cellules

Résultats & interprétations:

A: La préparation AC3 donne des arcs d'immunoprécipitation avec les trois extraits végétaux testés. Ce test de réactions croisées constituait un préalable indispensable à l'éventuelle utilisation des IgG AC3 dans l'étude de la Rubisco sur d'autres matériels végétaux qu'*Abrus precatorius*.

La Rubisco foliaire d'*Abrus* présente des déterminants antigéniques communs avec l'enzyme extraite de feuilles de *Tephrosia* et de *Catharanthus*. Par contre, les arcs issus des extraits TF et CF se croisent sans montrer de déterminants antigéniques communs, mettant ainsi en évidence des différences dans la Rubisco extraite de feuilles de *Tephrosia vogelii* et de *Catharanthus roseus*.

B: Les extraits CF et CC d'une part, et TF et TC d'autre part donnent, avec l'antisérum AC3, des arcs jointifs. Pour ces deux plantes, la Rubisco extraite de feuilles et de cellules photomixotrophes présente donc des déterminants antigéniques identiques. Il est donc tout à fait envisageable d'utiliser la préparation AC3 pour l'étude de la Rubisco dans des cultures cellulaires photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* et de *Catharanthus roseus*.

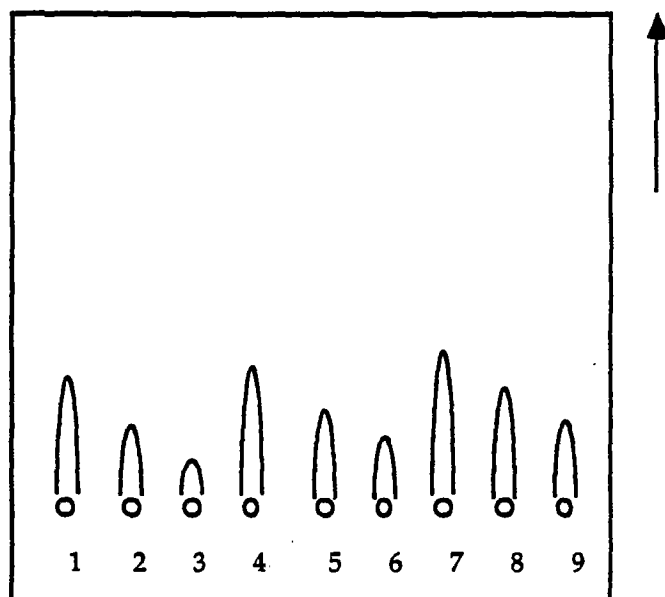
Des expérimentations préliminaires ont été entreprises, en collaboration avec C. NEF, sur la caractérisation immunoenzymologique de mutants de *Catharanthus roseus* présentant une dépigmentation spontanée à la lumière ("albinos"). Au vu des premiers résultats, cette dépigmentation s'accompagnerait d'une disparition totale de la Rubisco.

TEST DE MANCINI:

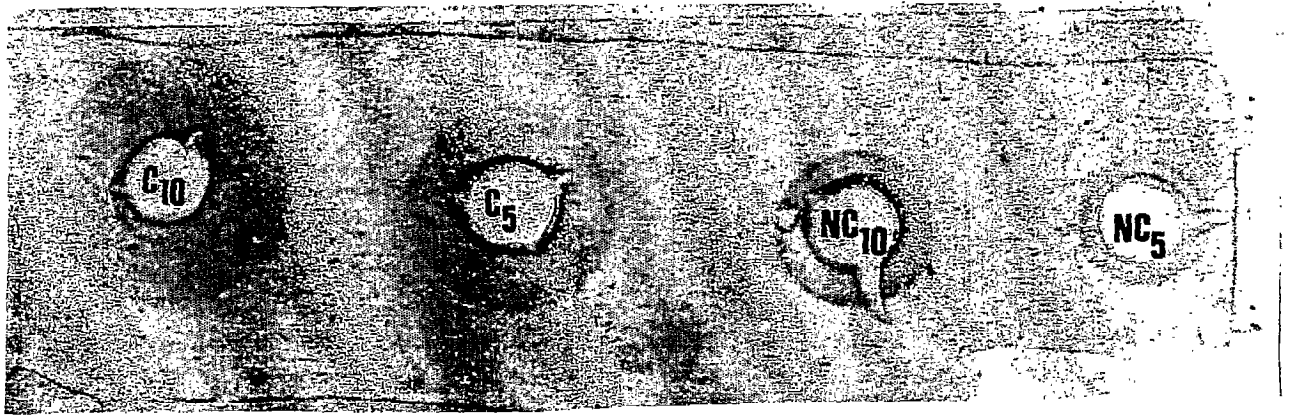
Ce test est réalisé à l'aide d'IgG Anti Rubisco de Tabac. Le gel d'immunodiffusion contient 50 µl d'antisérum pour 30 ml de solution gélosée.

Les extraits enzymatiques de cals d'*Abrus*, chlorophylliens (C) ou non (NC), sont concentrés 4 fois à l'aide d'un dispositif Centricon (Amicon) PM 30. Ils présentent une teneur en protéines solubles d'environ 15 mg.ml⁻¹.

Figure n° 62 : Schéma d'une immunoélectrophorèse de Rubisco extraite de cals d'Abrus hétérotrophes ou photomixotrophes



- 1 : Rubisco foliaire Epinard pure (12 μ g)
- 2 : Rubisco foliaire Epinard pure (6 μ g)
- 3 : Rubisco foliaire Epinard pure (3 μ g)
- 4 : Cals d'Abrus mixotrophes (50 μ g protéines)
- 5 : Cals d'Abrus mixotrophes (25 μ g protéines)
- 6 : Cals d'Abrus mixotrophes (12,5 μ g protéines)
- 7 : Cals d'Abrus hétérotrophes (100 μ g protéines)
- 8 : Cals d'Abrus hétérotrophes (50 μ g protéines)
- 9 : Cals d'Abrus hétérotrophes (25 μ g protéines)



LEGENDE

C₅ : cals d'*Abrus* Chlorophylliens (dépôt 5 μ l)

NC₅ : cals d'*Abrus* Non Chlorophylliens. (dépôt 5 μ l)

C₁₀ : cals d'*Abrus* Chlorophylliens (dépôt 10 μ l)

NC₁₀ : cals d'*Abrus* Non Chlorophylliens (dépôt 10 μ l)

Résultats & interprétations:

Les extraits issus de cals chlorophylliens présentent des teneurs en Rubisco très supérieures aux extraits de cals non chlorophylliens. Ces résultats corroborent et complètent les mesures d'activités spécifiques effectuées sur ces mêmes extraits.

La Rubisco détectée dans le cals hétérotrophes à l'obscurité est donc présente sous une forme active.

Nous avons pu mesurer les activités Rubisco suivantes sur les cals de la lignée 6H:

- lignée chlorophyllienne (26 jours) : 0,39 μ moles CO₂ fixées. h⁻¹. mg⁻¹ prot.

- lignée non chlorophyllienne (20 jours) : 0,12 μ moles CO₂ fixées. h⁻¹. mg⁻¹ prot.

4) Immunoélectrophorèse: (Figure n° 62)

Nous avons tenté de quantifier la Rubisco présente dans les extraits de cals d'*Abrus precatorius* décrits ci-dessus. Les extraits bruts ont été concentrés après précipitation au sulfate d'ammonium à 50%. Les extraits C (chlorophylliens) sont concentrés 5 fois, et les extraits NC (non chlorophylliens) 12 fois.

Nous avons coulé dans le gel 50 μ l une solution d'anticorps anti Rubisco de Maïs (AC3).

La faible coloration obtenue dans ce cas sur les immunorockets ne nous a pas permis d'exploiter la plaque d'électrophorèse obtenue par photocopie. Nous la présentons à la figure n° 62 sous forme de schéma simplifié.

La hauteur des pics, rapportée à la gamme étalon effectuée dans les mêmes conditions, nous a permis de calculer le pourcentage approximatif de Rubisco rapporté aux protéines solubles totales dans chaque extrait.

On obtient un taux relatif en Rubisco de 15% dans les cals d'*Abrus* hétérotrophes et de 8% dans les cals photomixotrophes.

Ce résultat confirme les mesures d'activités précédemment réalisées, et la première titration effectuée par la méthode de MANCINI.

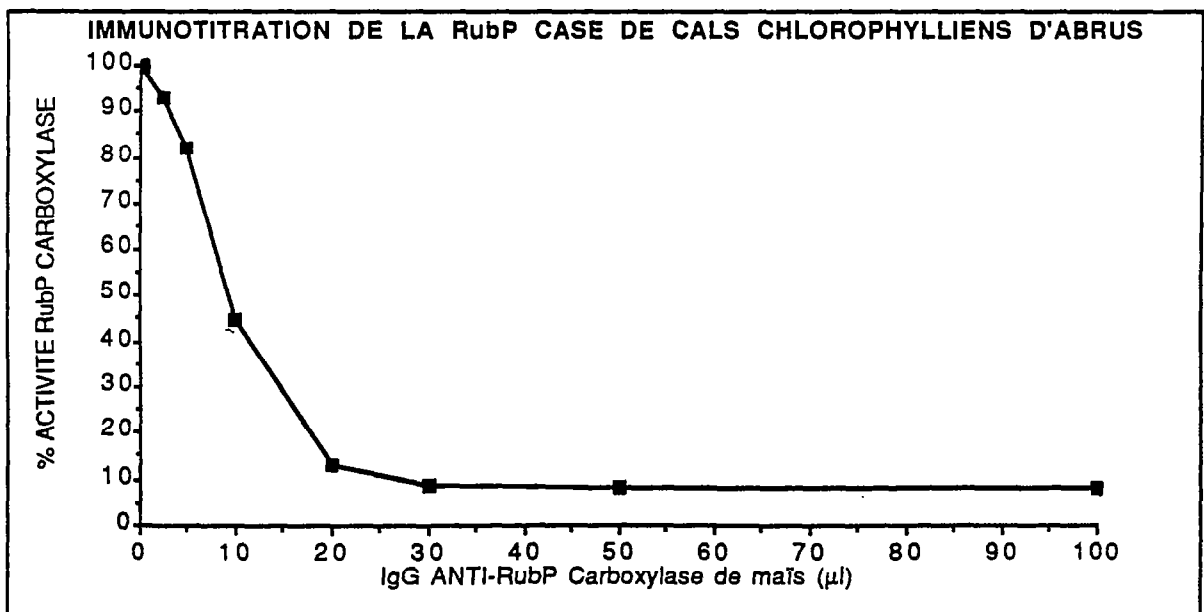
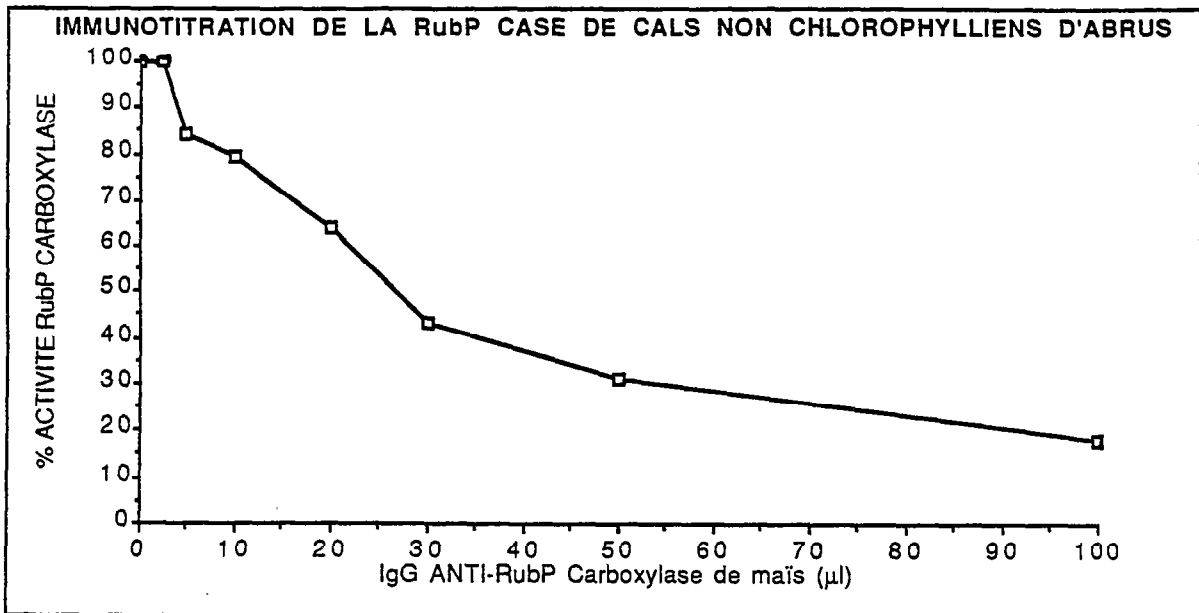


Figure n° 63 : Immunotitration de la Rubisco extraite de cals d'Abrus chlorophylliens ou non.

5) Immunotitration de l'activité RubP Carboxylase: (Figure n° 63)

Nous avons incubé 100 µl d'extraits bruts (C et NC) dans des cônes Eppendorf en présence d'une gamme de 0 à 30 µl d'antisérum AC3 non dilué. Pour un volume total de 210 µl (complétés avec le tampon d'extraction), 10 µl de sérum pré-immun sont rajoutés pour chaque concentration en antisérum. L'incubation dure ici 5 heures à 4°C. Des temps d'incubation plus longs (12 heures) peuvent être choisis, au risque de provoquer une dégradation notable de l'enzyme.

Après centrifugation (30 000 g - 15 minutes), l'activité est mesurée sur 200 µl de surnageant. Les courbes d'immunotitration sont présentées sur la figure n° 63.

On remarque que l'extrait NC a subi, au cours de l'incubation, une importante dégradation (perte de 60% environ de l'activité en 5 heures, à 4°C).

L'extrait porte encore une antigénicité mesurable, mais il est difficile d'interpréter simultanément les deux courbes d'immunotitration des extraits C et NC. En effet, le 100% d'activité de l'extrait NC correspond à des valeurs beaucoup plus faibles.

L'immunoprécipitation de la totalité de l'activité pour l'extrait C confirme bien la reconnaissance immuno-chimique de l'enzyme par un antisérum dressé contre la Rubisco de maïs. Nous pouvons ainsi confirmer les parentés immunologiques entre ces deux enzymes mises en évidence par les tests d'immunodiffusion.

En outre, les résultats précédemment obtenus lors de la réalisation d'immunoempreintes nous permettent d'affirmer que cette homologie porte uniquement sur la grande sous-unité LSU de la Rubisco.

Cette hypothèse est confirmée par les résultats de nombreuses équipes travaillant, le plus souvent à l'aide de techniques immunologiques, sur la phylogénie de la Rubisco dans le règne végétal. En effet, la structure primaire de la grande sous-unité présente une grande homologie pour les végétaux supérieurs, les algues et les bactéries photosynthétiques (voir la récente revue bibliographique de SUZUKI -1987).

6) Conclusions:

Au terme de cette étude immuno-enzymologique de la Rubisco extraite de notre matériel végétal, plusieurs points apparaissent dignes d'intérêt:

- les anticorps IgG Anti-Rubisco foliaires de Maïs et de Tabac mis à notre disposition par le LSMP Orsay ont montré une reconnaissance positive avec la Rubisco extraite d'*Abrus precatorius*.

- La Rubisco extraite de feuilles, de cals ou de cultures cellulaires d'*Abrus* photomixotrophes ou hétérotrophes présente les mêmes déterminants antigéniques.

- Les tests de reconnaissance croisée permettent d'affirmer que les préparations d'IgG utilisées pourront être appliquées à d'autres plantes cultivées *in vitro* dans notre Laboratoire.

Cette caractérisation une fois achevée, il importe de mettre en application ces techniques pour la quantification de la Rubisco dans les cultures cellulaires d'*Abrus* hétéro- ou photomixotrophes.

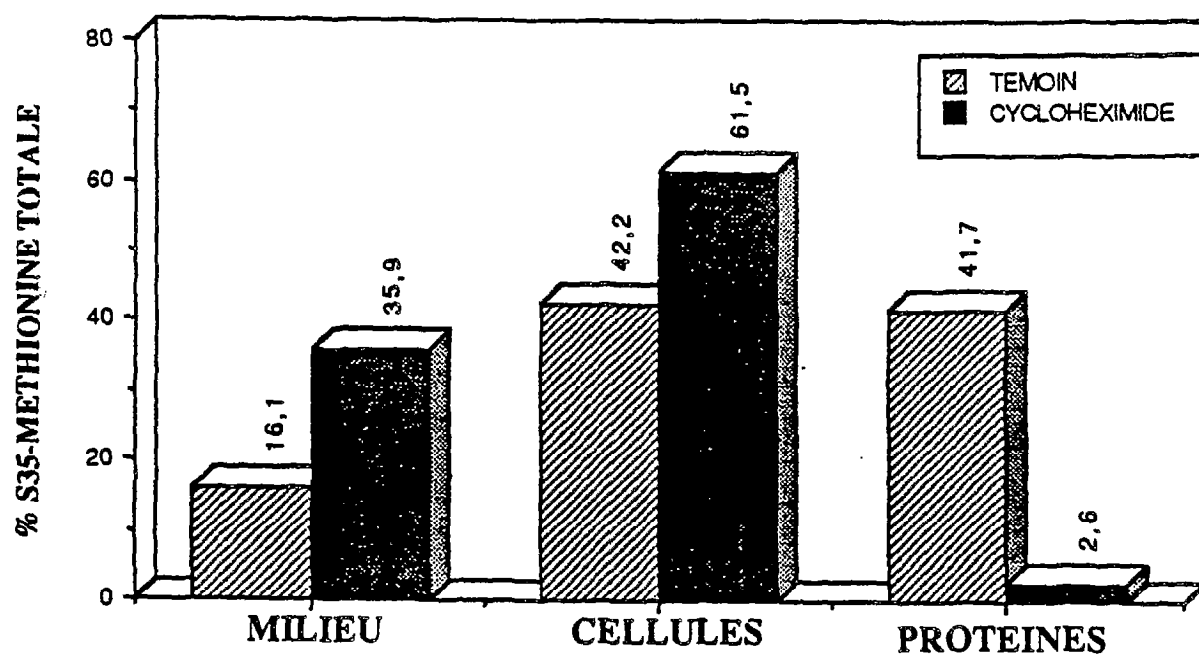
Dans un premier temps, nous pourrions ainsi estimer (par superposition des courbes d'immunotitration) le rapport des formes actives/inactives de la Rubisco dans diverses conditions:

- cultures hétéro- ou photomixotrophes;
- cultures en bioréacteur ou en fioles agitées;

- étude cinétique de la quantité d'enzyme néosynthétisée au cours de la croissance de suspensions cellulaires.

Enfin, les tests préliminaires réalisés au cours de cette étude nous permettent d'envisager, à très court terme, l'utilisation de techniques de quantification enzymatique plus performantes telles que les tests ELISA, d'ores et déjà employés pour les dosages en série de Rubisco par diverses équipes (PRATT *et al* - 1986, CATT & MILLARD - 1988).

A



B

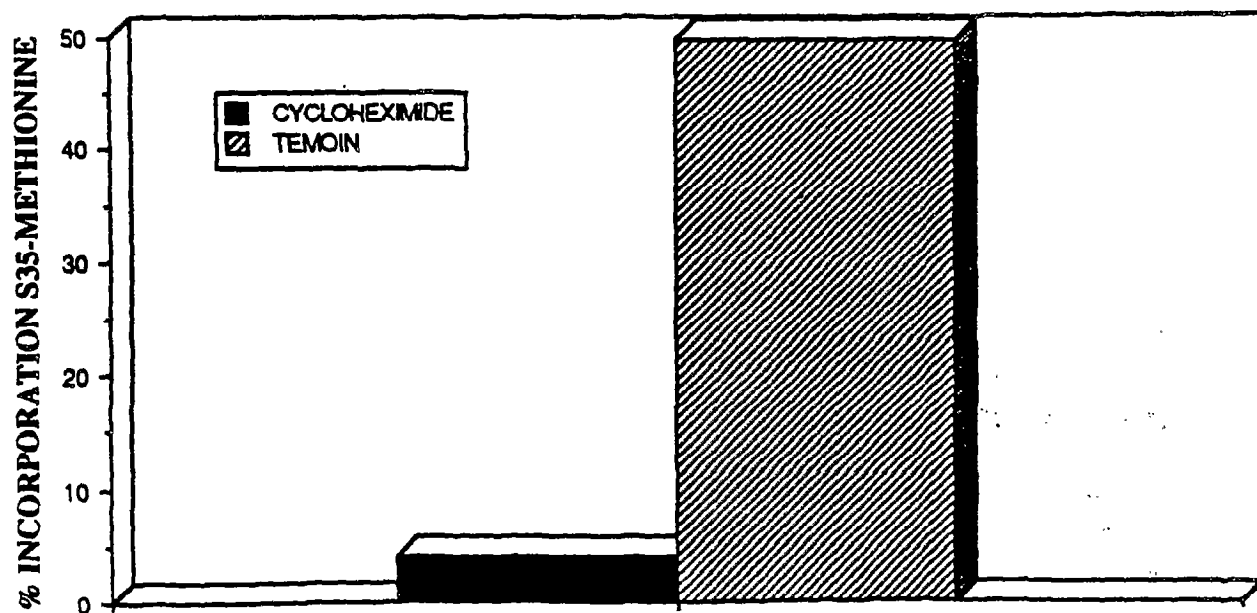


Figure n° 64 : Influence de la Cycloheximide sur l'incorporation de ³⁵S méthionine

E) QUELQUES ASPECTS DE LA REGULATION DE DIVERS SYSTEMES ENZYMATIQUES DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES D'*ABRUS PRECATORIUS*:

1) Mise en évidence de néosynthèses protéiques:

a) Problématique:

Dans des suspensions cellulaires de plusieurs espèces végétales (*Nicotiana tabacum*, *Silene alba*) un suivi de l'Activité Nitrate Réductase a été réalisé au cours d'un cycle en batch-culture. (HOAREAU & NATO - Communication personnelle; POULLE & RAMBOUR - 1979). Ces auteurs notent une augmentation nette de l'activité Nitrate Réductase dès les premières heures de culture (7/8 heures), précédant le pic d'activité classiquement rencontré quelques jours après le repiquage.

L'inductibilité de la Nitrate Réductase par son substrat (NO_3), comme par beaucoup d'autres facteurs, a été clairement établie. Dans notre cas, il importe de savoir si cette apparition d'activité est le résultat de néosynthèses protéiques, ou de l'activation de précurseurs préexistants de l'enzyme. L'utilisation d'un inhibiteur post-traductionnel de la protéosynthèse: la cycloheximide, va nous permettre d'apporter quelques réponses. Nous suivrons l'activité de la synthèse protéique par l'incorporation de méthionine marquée au Soufre radioactif ^{35}S .

L'utilisation d'inhibiteurs de la protéosynthèse dans l'étude de l'induction nitrique de la NR de suspensions cellulaires végétale est désormais classique (RAMBOUR *et al* - 1979).

Néanmoins, peu d'équipes ont, à notre connaissance, étudié l'impact de ces molécules sur la quantité d'enzymes néosynthétisées, au lieu des mesures d'activité habituellement réalisées.

Par immunosélection suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE, nous allons détecter la radioactivité ^{35}S spécifiquement incorporée dans deux enzymes-cibles: Nitrate Réductase & Rubisco.

Cette expérimentation a été réalisée au sein du Laboratoire de Structure et Métabolisme des Plantes de l'Université de PARIS XI (Orsay) sur notre matériel végétal: suspensions cellulaires chlorophylliennes d'*Abrus precatorius* lignée 6H.

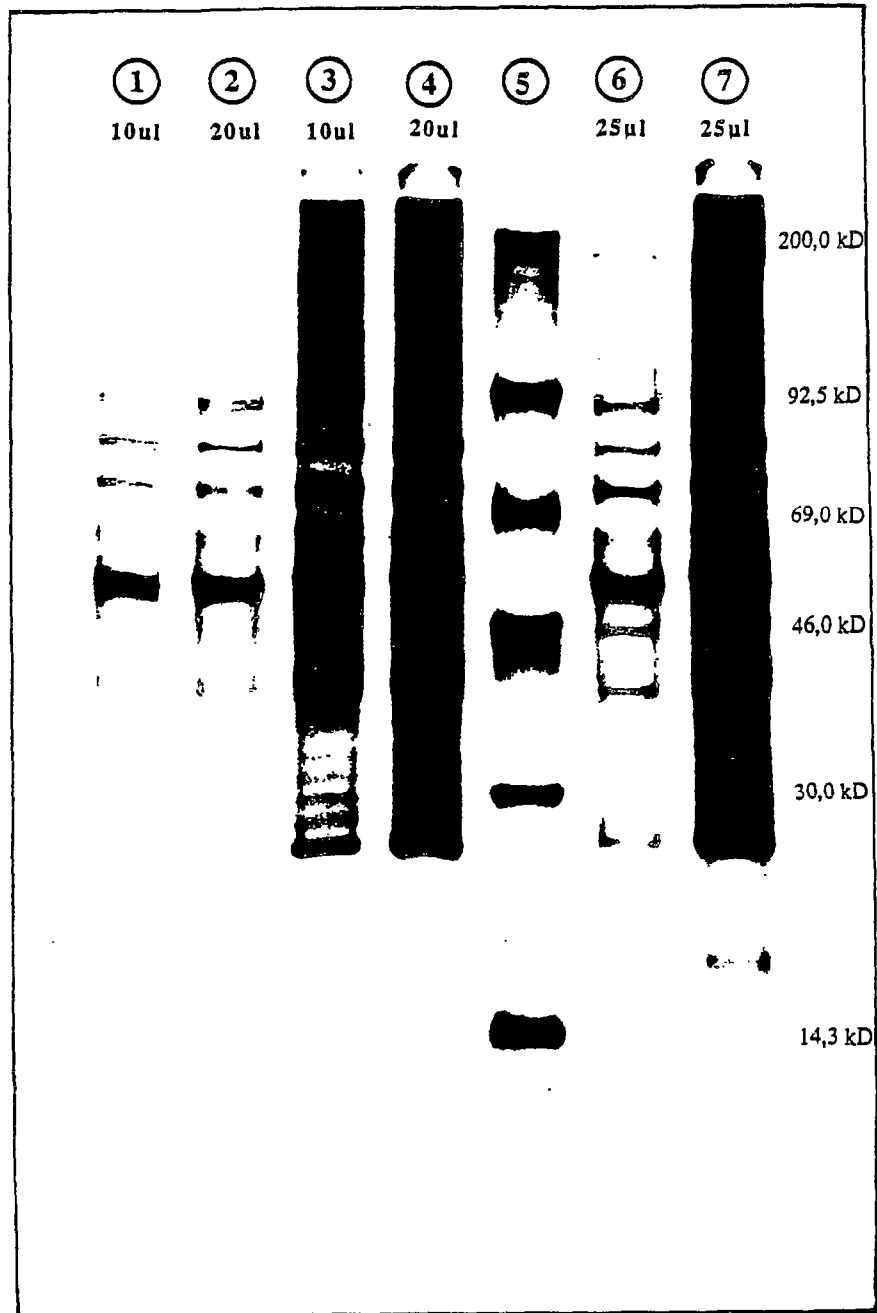
b) Résultats & discussion:

Dans un premier temps, nous avons suivi l'effet du cycloheximide sur l'incorporation de ^{35}S méthionine dans l'ensemble du pool protéique. Les résultats sont présentés sous forme de diagrammes (Fig.: 64).

La méthionine marquée restant dans le milieu en fin d'incubation est deux fois plus importante pour les cellules traitées au cycloheximide (figure n° 64 A). La quantité totale de méthionine intracellulaire représente 83,9% du total pour les témoins, et seulement 64,1% pour la population traitée. La cycloheximide joue donc déjà un rôle au niveau de la pénétration même de l'acide aminé marqué dans la cellule.

C'est sur l'incorporation proprement dite que les différences sont les plus nettes (figure n° 64 -B). En effet, les suspensions témoins incorporent dans les protéines solubles 50% environ de la méthionine marquée disponible alors que ce pourcentage d'incorporation est seulement de 4% après action de l'inhibiteur.

AUTORADIOGRAPHIE SDS-PAGE DES EXTRAITS BRUTS



LEGENDE:

1 & 2: EXTRAIT BRUT. *Culture + Cycloheximide*

3 & 4: EXTRAIT BRUT. *Culture Témoin.*

5: MARQUEURS STANDARDS DE POIDS MOLECULAIRE méthylés ^{14}C (AMERSHAM).

6: EXTRAIT BRUT. *Culture + Cycloheximide*

7: EXTRAIT BRUT. *Culture Témoin.*

L'autoradiographie après SDS-PAGE des extraits cellulaires (Fig n° 65) fait apparaître une densité en protéines marquées nettement supérieure pour la suspension-témoin. Les profils électrophorétiques des deux extraits paraissent identiques.

L'électrophorèse après immunosélection montre une augmentation de la densité des bandes caractéristiques de chaque protéine (Fig n° 61). Pour la Rubisco, les 2 sous-unités LSU et SSU sont porteuses de radioactivité: elles sont toutes deux le résultat de néosynthèses. En effet, dans les cellules traitées au cycloheximide, la radioactivité mise en évidence dans ces deux bandes est nettement plus faible.

De même, la Nitrate Réductase présente, après immunosélection, les deux bandes très rapprochées à 100 kD classiquement observées après dénaturation pour cette enzyme. La quantité d'enzyme présente dans les cellules traitées est très faible par rapport au témoin, apportant ainsi la preuve d'une synthèse *de novo* de Nitrate Réductase.

Durant les heures suivant le repiquage, la suspension cellulaire est le siège de synthèses protéiques actives. Les pics d'activité Nitrate Réductase et de Rubisco observés correspondent vraisemblablement à une synthèse *de novo* de ces enzymes. Une fois cette notion acquise, plusieurs points dignes d'intérêt restent à éclaircir et à compléter.

Il reste à déterminer la part d'enzyme présente au temps zéro sur celle de la forme nouvellement apparue. La technique de tests ELISA, aujourd'hui parfaitement standardisée pour la quantification de la nitrate réductase, constitue un outil de choix pour ce type de travail. Les dosages ELISA ont dernièrement été mis au point sur des cultures cellulaires de tabac au LSMP Orsay, en collaboration avec le service du Dr. CABOCHE (INRA -Versailles). En collaboration avec ces organismes, l'adaptation de la technique ELISA à la NR et la Rubisco extraite de notre matériel végétal semble réalisable à très court terme.

En outre, l'importance de ces néosynthèses précoces reste à étudier sur un matériel cellulaire strictement hétérotrophe, en vue de mettre en évidence d'éventuelles différences en fonction du comportement photosynthétique des cellules. Il serait intéressant de compléter nos expérimentations afin de savoir si:

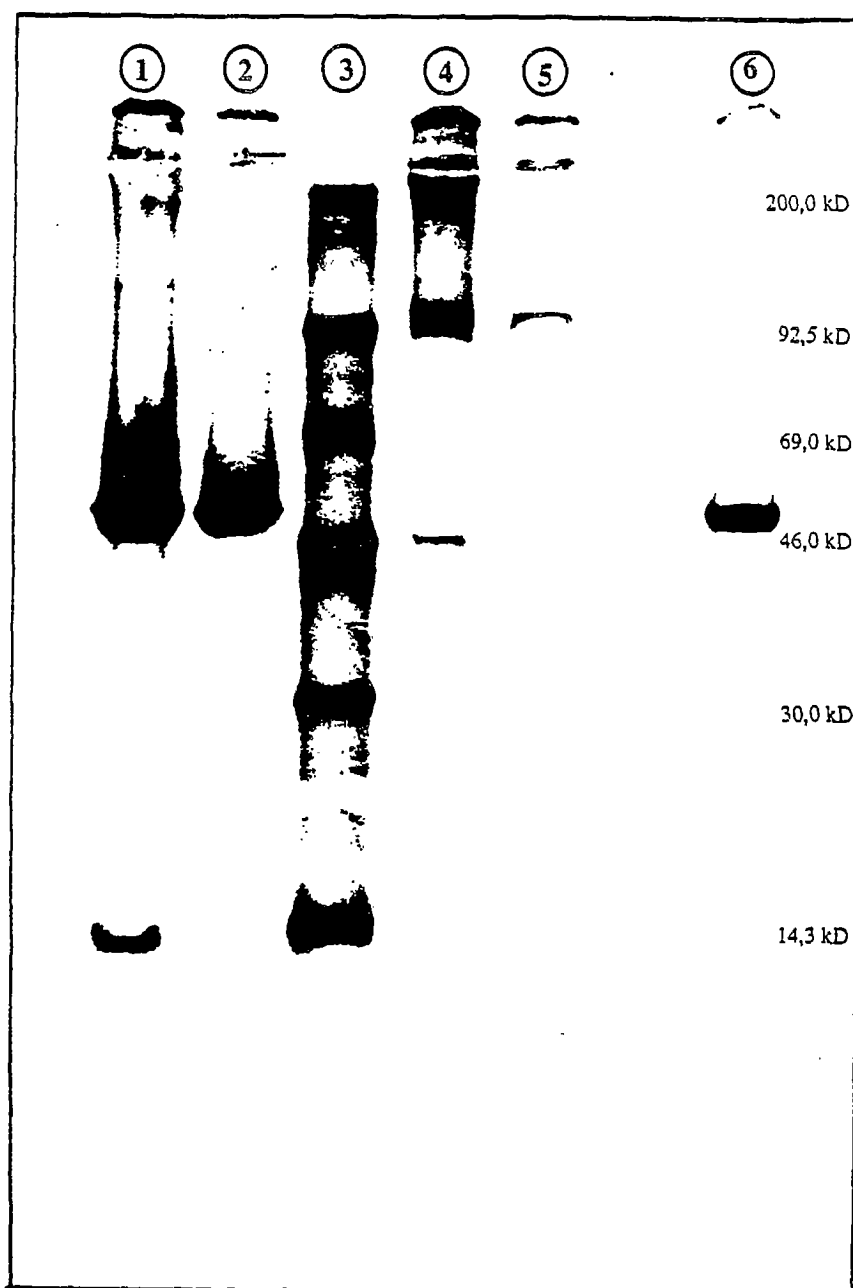
- d'une part: un système totalement hétérotrophe est également capable de néosynthétiser la Rubisco, enzyme "facultative" pour un tel système.
- d'autre part, une suspension cellulaire repiquée dans un milieu dépourvu de nitrates, peut aussi montrer une synthèse *de novo* de nitrate réductase
- enfin, cette néosynthèse de Nitrate Réductase est sensible à des facteurs exogènes tels que la lumière

L'action d'inhibiteurs de la synthèse des protéines et des ARN sur la néosynthèse de NR a été étudiée par divers auteurs (ASLAM *et al.* -1973; BEEVERS & HAGEMAN - 1969; POULLE & RAMBOUR - 1979...) L'existence d'une nitrate réductase constitutive et fonctionnelle a été, par ailleurs, clairement démontrée (GUERRERO *et al.* - 1981).

POULLE & RAMBOUR (1979) utilisent un inhibiteur de la transcription, la 6 Méthyl purine, et des inhibiteurs de la traduction: la cycloheximide et le chloramphénicol. Ces auteurs confirment sur des suspensions cellulaires de *Silene alba*, que le transfert des cellules sur un milieu neuf contenant de nitrates induit deux périodes de néosynthèse d'ARN, l'une à la 6^e heure de culture, l'autre plus tardive vers le 3^e jour.

Plusieurs auteurs ont récemment mis en évidence l'induction nitrrique par une augmentation nette des ARNm spécifiques de la nitrate réductase (CHENG *et al.* - 1986; RAJASHEKAR & OELMULLER -1987).

AUTORADIOGRAPHIE SDS PAGE APRES IMMUNOSELECTION



LEGENDE:

- 1) IMMUNOSELECTION (Protéine A- Sépharose + IgG Anti-Rubisco Tabac). *Culture Témoin*
- 2) IMMUNOSELECTION (Protéine A- Sépharose + IgG Anti-Rubisco Tabac). *Culture + Cycloheximide.*
- 3) MARQUEURS STANDARDS DE POIDS MOLECULAIRE méthylés ^{14}C (AMERSHAM).
- 4) IMMUNOSELECTION (Protéine A- Sépharose + Anti-NR monoclonal INRA 96925). *Culture Témoin.*
- 5) IMMUNOSELECTION (Protéine A- Sépharose + Anti-NR monoclonal INRA 96925). *Culture + Cycloheximide.*
- 6) Idem 2) ; x1/2 volume de dépôt.

Plus récemment, les techniques de biologie moléculaire ont permis de préciser considérablement les hypothèses concernant la régulation de la NR chez les végétaux supérieurs.

Quelques équipes ont réussi à isoler les ARN messagers codant pour la NR, et cloner les ADN complémentaires correspondant dans des vecteurs d'expression (CHENG *et al.* - 1986). La cartographie de ces gènes a ainsi pu être précisée (CHENG *et al.* - 1988).

CRAWFORD *et al.* (1986) montrent, sur des germinations de *Cucurbita maxima*, que l'induction nitrique provoque une néosynthèse très importante d'ARNm spécifiques de la nitrate réductase. Ces ARNm se révèlent être 120 fois plus abondants dans les cotylédons traités par les nitrates. En outre, les techniques d'ADN recombinant ont permis de montrer que ces ARN messagers codaient pour des épitopes communs à plusieurs espèces végétales. (CALZA *et al.* - 1987). Néanmoins, la part entre la néosynthèse d'ARNm et la traduction de messagers prétranscrits dans l'induction par les nitrates reste encore mal connue. (RAJASHEKAR & OELMULLER - 1987).

Des expérimentations complémentaires ont dernièrement été mises au point, en collaboration avec le LSMP Orsay, afin de tester l'effet de plusieurs inhibiteurs (Cycloheximide, Chloramphénicol, 6 Méthyl purine) sur la synthèse de quatre systèmes enzymatiques (NR, GS, Rubisco & PEPc). Les premiers résultats obtenus sur notre matériel végétal sont encourageants, mais demandent à être confirmés par des essais complémentaires.

L'action spécifique de ces molécules inhibitrices nous permettra de faire la part dans l'action de l'inducteur entre traduction et transcription et également entre néosynthèses nucléaires ou chloroplastiques.

2) Etude des isoformes de divers systèmes enzymatiques:

a) Problématique:

La régulation de l'activité des systèmes enzymatiques au cours de la vie d'une plante (ou d'une cellule isolée) peut porter, dans de nombreux cas, sur la synthèse, puis l'assemblage de plusieurs isoformes afin de constituer une enzyme fonctionnelle (GS, Rubisco, GDH, etc...).

Nous avons cherché à savoir, pour quatre systèmes enzymatiques différents (GDH, POX, PAC, GOT) si le nombre des isoformes rencontrées pouvaient varier:

- entre plante entière, cals, et cultures cellulaires *in vitro*
- entre cellules hétérotrophes et photomixotrophes
- entre cellules d'âges différents issues d'une même culture

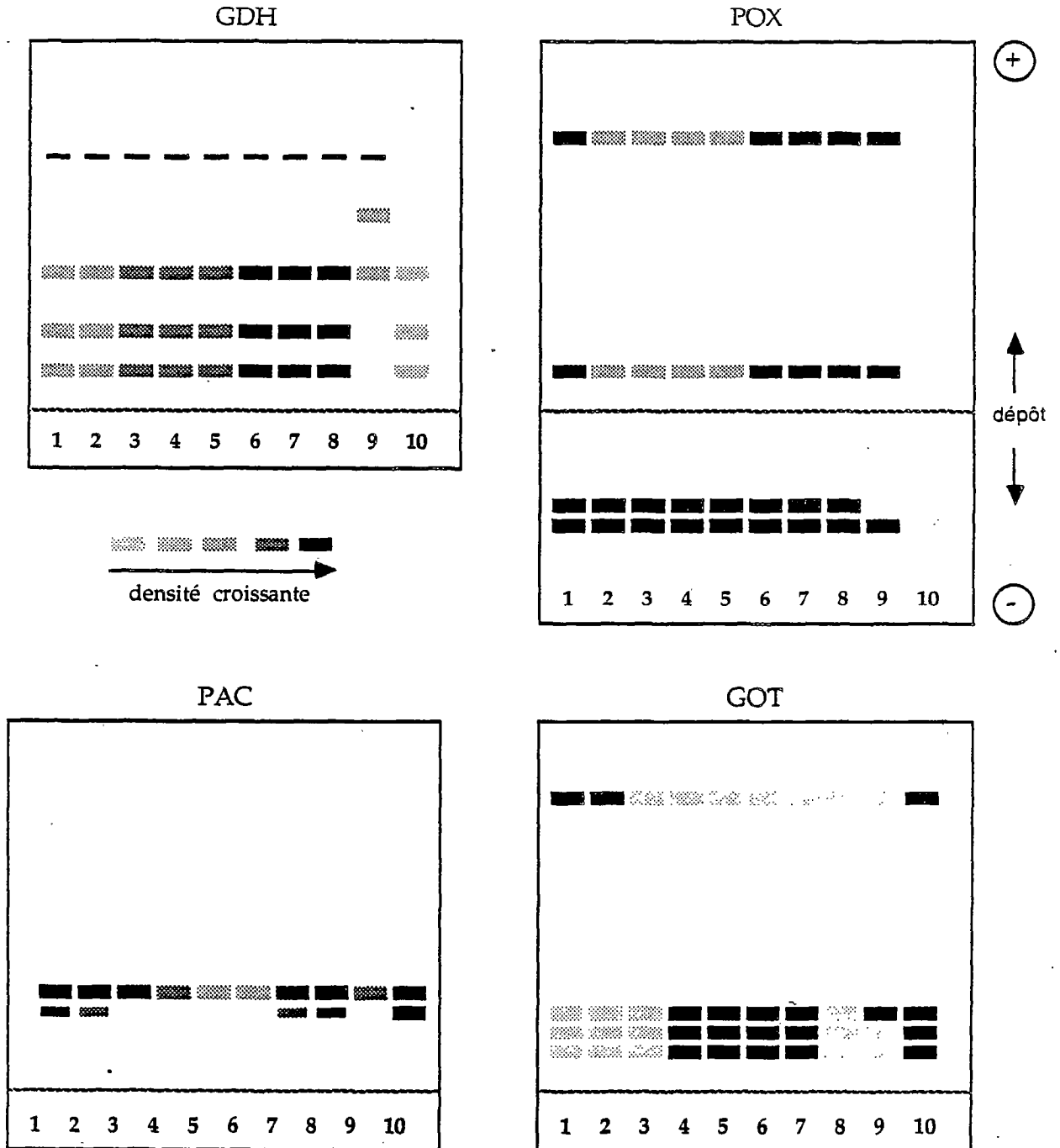
Les résultats des migrations électrophorétiques sont représentés sous forme de schémas simplifiés sur les figures n° 66 & 67.

Remarques: 1) Les extraits enzymatiques bruts obtenus à partir des suspensions cellulaires ont été réalisés en conservant pour tous les échantillons le même rapport biomasse/volume de tampon (=1/1 w./v.). Nous avons ainsi pu assurer un minimum d'homogénéité entre les dépôts. Les migrations électrophorétiques ne sont cependant pas réalisées à concentration égales en protéines, mais peuvent renseigner sur l'activité totale (par rapport à la biomasse fraîche) du système considéré.

2) Les schémas présentés sont le résultat d'une seule électrophorèse, leur interprétation doit être faite avec prudence.

**Figure n° 66 : Représentations schématiques des
ELECTROPHORESSES SUR GEL D'AMIDON**

Révélation spécifique des activités enzymatiques
Suspension hétérotrophe en fiole



Légende :

- 1 - Suspension cellulaire hétérotrophe : inoculum
- 2 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 1 jour
- 3 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 2 jours
- 4 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 3 jours
- 5 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 5 jours

- 6 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 8 jours
- 7 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 11 jours
- 8 - Suspension cellulaire hétérotrophe : 14 jours
- 9 - Cal hétérotrophe 6 H : 12 jours
- 10 - Feuilles

b) Résultats et discussions: (Figures n° 66 & 67)

1) Glutamate deshydrogénase (GDH) :

Pour les deux types de suspensions, hétérotrophes et mixotrophes, l'activité GDH est visualisable tout au long de la culture. L'enzyme présente toujours quatre isoformes actives dans les extraits cellulaires. On en décelé cinq dans les cals photomixotrophes, et trois dans les cals photomixotrophes.

Il est intéressant de remarquer que les extraits foliaires, bien que nettement plus concentrés en protéines solubles, présentent une activité GDH à peine décelable. Ce résultat confirme les hypothèses de MIFLIN & LEA (1976); ces auteurs attribuent à la voie GS/GOGAT un rôle prépondérant, par rapport à la voie GDH, dans l'assimilation de l'ammonium chez la plante entière.

L'enzyme présente au moins trois isozymes communes entre les cultures cellulaires hétéro et photomixotrophes et feuilles de la plante entière.

Dans les suspensions photomixotrophes, la quatrième bande (la plus proche de la cathode, présente une activité à peine détectable.

Dans les cultures cellulaires d'*Abrus*, l'activité GDH est détectable durant toute la culture, avec un maximum d'intensité à partir du 8^e jour.

MURILLO & SANCHEZ DE GIMENEZ (1984) étudient l'évolution de plusieurs enzymes responsables de l'incorporation de l'ammonium dans des cultures cellulaires de *Bouvardia ternifolia*. Ces auteurs remarquent que sur un milieu MS, l'activité GDH croît régulièrement au cours de la culture.

BRASSART *et al.* (1984) mettent en évidence, sur des suspensions cellulaires de *Silene alba* cultivées en présence d'ammonium, un pic d'activité GDH vers le 8^e jour de culture. Ces auteurs effectuent de plus une électrophorèse sur gel de polyacrylamide des extraits totaux de cellules; après révélation par les sels de tétrazolium, ils mettent en évidence une activité GDH, localisée dans trois bandes. La GDH semble, sur ce matériel végétal, présenter au moins trois isozymes actives dont l'une est constante quelle que soit la nature de l'azote fourni, mais dont les autres varient avec l'âge de la culture et la forme sous laquelle est apporté l'azote.

Chez les végétaux supérieurs, la GDH peut être constituée de sept isozymes (SCHEID *et al.* - 1980; SECOND & TROUSLOT - 1980). Pour DE VIENNE (1983), ces formes résulteraient de l'association au hasard de deux ou trois sous-unités formant une enzyme hexamérique; une isozyme au moins est commune à différents organes d'une même plante.

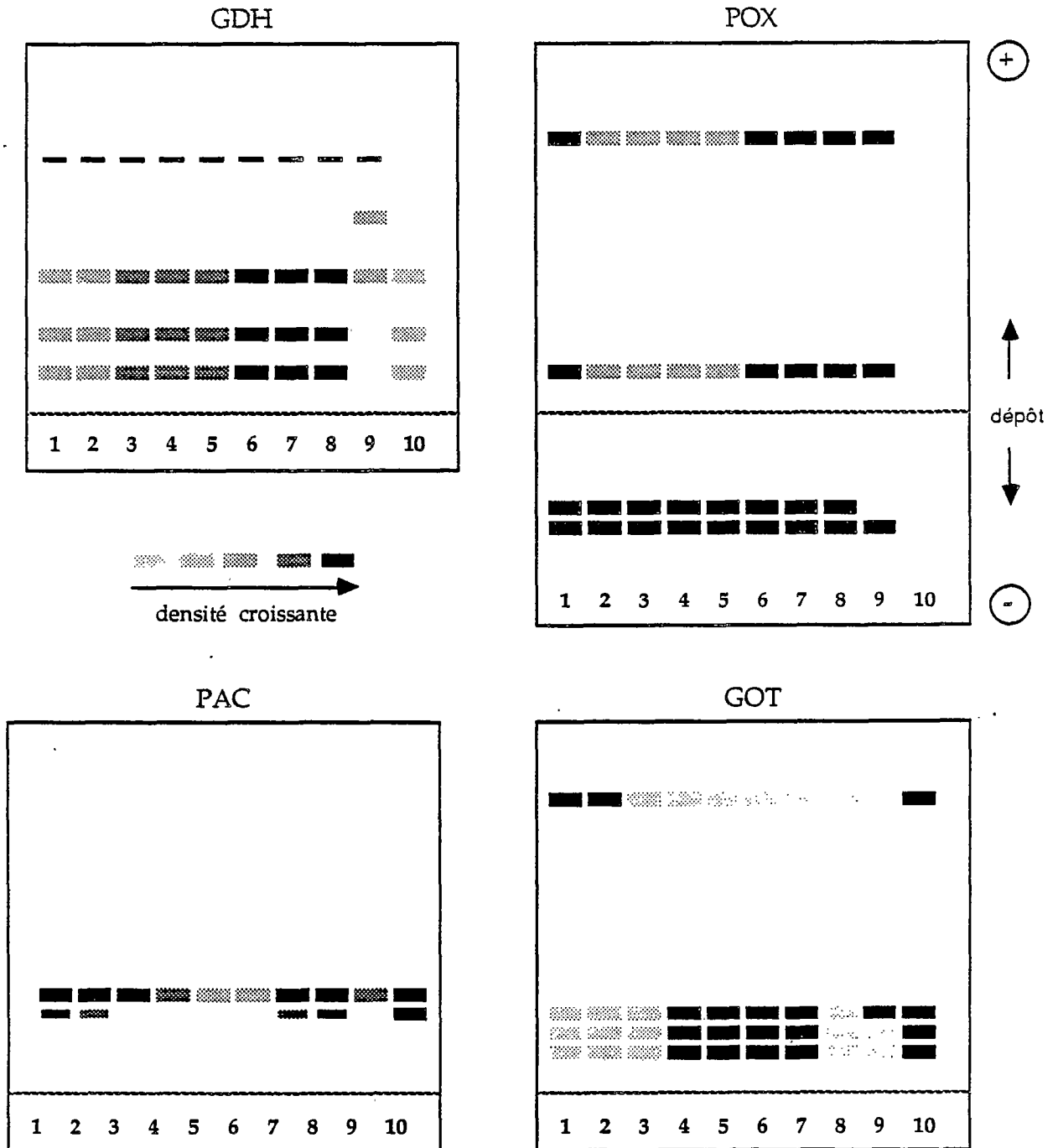
2) Peroxydases: (POX)

Les bandes électrophorétiques des peroxydases ne permettent pas de discerner de différences entre les cultures cellulaires hétéro- et mixotrophes, de différents âges. Les feuilles jeunes et chlorophylliennes, présentent une activité peroxidasique très faible. Les bandes deviennent de plus en plus épaisses et intenses au cours du vieillissement des cellules, surtout pour les isoformes cathodiques. Les isozymes anioniques varient peu au cours de la culture: elles restent au nombre de deux, et présentent une intensité constante. Les extraits de cals donnent, dans les deux types de culture, des profils différents de ceux des cellules: l'isoforme anionique la plus proche du dépôt est absente.

**Figure n° 67 : Représentations schématiques des
ELECTROPHORESSES SUR GEL D'AMIDON**

Révélation spécifique des activités enzymatiques

Suspension photomixotrophe en fiole



L'intensité des bandes croît avec l'âge de la culture. Nous avons précédemment vérifié l'apparition d'activité peroxydasique dans le milieu de culture de cellules d'*Abrus* sénescents à l'aide de tests rapides (oxydation du Gaiacol en présence d'eau oxygénée donnant des composés de couleur rouge caractéristique - diméthoxybiphéno-quinones).

BERGER *et al.* (1985) mettent en évidence une évolution semblable dans des cultures cellulaires de Pomme, confirmant ainsi les résultats de ARNISON & BOLL (1974) sur des cultures cellulaires de *Phaseolus vulgaris*, et de ALTMAN *et al.* (1982) sur des cultures statiques de péricarpe de fruits de *Citrus*.

Ce phénomène est parfaitement en accord avec la fonction de détoxification attribuée aux peroxydases. Rappelons que ces enzymes catalysent l'oxydation peroxydative de substrats donneurs d'hydrogène (R-H), souvent de type phénolique en donnant naissance à des composés quinoniques. Elles rentrent en compétition pour l'eau oxygénée avec d'autres systèmes générateurs de formes toxiques d'oxygène plus "agressives" tels que le radical hydroxyle OH^{\bullet} et l'oxygène singulet O^1_2 .

En outre, divers auteurs (GASPAR *et al.* - 1978; WOLTER - 1975) suggèrent que les isoperoxydases cathodiques sont les formes à activité AIA-oxydase, alors que les isozymes anodiques pourraient être associées à la lignification des cellules. Pour SECOND & TROUSLOT (1980), le nombre d'isozymes des peroxydases de feuilles de riz est extrêmement variable, en fonction du stade végétatif considéré.

3) Phosphatases acides (PAC):

Les phosphatases acides ne présentent pas, sur nos extraits, un large polymorphisme: en effet, deux bandes seulement sont visibles sur tous les zymogrammes (feuilles, cals et cellules). Des défauts dans la migration ou la préparation des gels sont sans doute à prendre en compte pour ces expérimentations: en effet, sur des extraits cellulaires photomixotrophes d'*Abrus*, nous avons précédemment visualisé quatre isoformes nettement séparées de phosphatases acides (résultat non illustré).

Dans les cellules hétérotrophes, les bandes deviennent moins visibles dans les cellules en phase de croissance exponentielle; ce phénomène est moins net pour les cellules photomixotrophes.

4) Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT):

La GOT extraite des cultures cellulaires hétérotrophes et mixotrophes présente 4 isozymes. L'importance relative de chaque isozyme varie en fonction de l'âge de la culture et de la nature du matériel végétal.

Dans les deux types de cultures cellulaires étudiées, l'enzyme est détectable surtout en cours de phase exponentielle de croissance (3^e au 11^e jour). Elle présente trois isozymes en commun avec la GOT foliaire.

Chez les cals, une isoforme sur les quatre est nettement détectable, suggérant un métabolisme de l'azote ammoniacal différent des feuilles et des cellules isolées.

La réalisation de ces zymogrammes nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une activité GOT décelable dans les cultures cellulaires et les cals d'*Abrus precatorius*.

Ce résultat vient en appui des mesures d'activité GS et de la mise en évidence d'isozymes actives de la GDH dans les cultures cellulaires et les cals d'*Abrus precatorius*.

Il concourt à montrer que les grandes voies d'assimilation de l'ammonium présentes dans la plante entière se retrouvent dans le matériel végétal cultivé *in vitro*.

5) Conclusions:

Quatre systèmes enzymatiques intervenant dans le métabolisme primaire ont pu être mis en évidence sous forme active dans des cultures cellulaires et des cals de prolifération d'*Abrus precatorius*.

La réalisation de ces zymogrammes, à l'aide de méthodes simples, nous a par conséquent permis de vérifier la permanence des grandes voies métaboliques de la plante entière sur notre matériel cultivé *in vitro*.

Pour certains des systèmes enzymatiques étudiés (GOT, PEROX) le nombre et l'importance relative des isoformes entre plante et matériel cultivé *in vitro* semblent différer.

Au cours d'une même culture cellulaire, aucune des quatre enzymes étudiées ne semble régulée par la synthèse ou la disparition de l'une de ses isoformes.

Ces résultats demandent, bien sûr à être confirmés par d'autres électrophorèses, avec un équipement offrant une meilleure résolution (gels de polyacrylamide, électrophorèses verticales sur des gels de plus grande taille), mais aussi des mesures d'activité de ces quatre systèmes au cours d'une même culture.

F) OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES:

1) Microscopie optique: Planche n° 3 (Photos n° 3 & 4)

Les observations microscopiques, réalisées sur la lignée 6H photomixotrophe, révèlent la présence de nombreux chloroplastes (de 5 à 10) disposés régulièrement dans la cellule. (Photo n° 4)

Les cellules observées présentent une taille isodiamétrique (de 50 à 100 μ), de forme ellipsoïdale. La présence de cellules géantes (généralement polyploïdes) est rare, signe d'une suspension en cours de stabilisation, où les mitoses atypiques sont peu fréquentes.

L'observation en contraste de phase (Photo n° 3) permet de mettre en évidence les différents types de groupements cellulaires rencontrés.

La suspension 6H, relativement fine et homogène, est composée en majorité de microcals de 4 à 50 cellules, de doublets (cellules en cours de mitose) et de cellules isolées.

2) Microscopie électronique:

Le travail de microcoupe et de préparation des échantillons étant réalisé par un laboratoire extérieur (Laboratoire de Microscopie Electronique/USTL Montpellier), les résultats disponibles lors de la mise sous presse du présent ouvrage concernent uniquement les cals de prolifération; des échantillons cellulaires sont actuellement en cours de préparation.

L'observation a été réalisée sur trois types de matériel :

- cals 6H hétérotrophes
- cals 6H hétérotrophes en cours de verdissement
- cals 6H photomixotrophes

a) cals hétérotrophes:

Ces cals proviennent de cultures statiques initialement chlorophylliennes ayant subi 22 repiquages à la lumière, puis 11 repiquages à l'obscurité.

Les cellules observées sont très vacuolisées, le cytosol, très dense, est repoussé vers le plasmalemm. On remarque la présence de un à deux amyloplast, chargés de volumineux grains d'amidon (Planche n° 5 - photo A). Aucune différenciation intra-plastidiale n'est visible. La présence de mitochondries au voisinage de ces amyloplast suggère l'existence d'une glycolyse active chez les cals hétérotrophes. (Planche n° 4 - photo 1)

Sur ce matériel, les plastes n'ont aucune fonction assimilatoire; leur rôle consiste en un stockage des réserves amylacées de la cellule. Ce résultat confirme les observations de BRANGEON & NATO (1981) sur des cellules de tabac ayant subi trois repiquages à l'obscurité. Ces auteurs décrivent des cellules hypervacuolisées, contenant des plastes dépourvus de lamelles thylakoïdales.

b) cals en cours de verdissement:

Une lignée statique chlorophyllienne après 36 passages à la lumière est repiquée une fois à l'obscurité (3 semaines), puis replacée à la lumière. Après 21 jours à la lumière, les cals reverdisent partiellement. Ils sont alors récoltés, fixés et inclus dans la résine

de Spurr pour la microscopie.

L'observation des coupes révèle des chloroplastes partiellement différenciés (Planche n° 5 - photo B) Ces derniers présentent des empilements granaires à peine visualisables en photographie noir & blanc (planche n° 7 - photo A). Après traitement informatique des images obtenues, on peut discerner plus nettement l'ébauche des structures intraplastidiales (Planche n° 4 - photo 2) .

La présence d'un réticulum endoplasmique entourant le chloroplaste est le signe d'un fonctionnement perturbé de cet organite.

BRANGEON & NATO (1981) décrivent ces organites comme étant des proplastides, offrant une structure semblable à celle rencontrée dans les cellules méristématiques des végétaux supérieurs.

Contrairement à ces auteurs, on ne remarque pas, sur notre matériel, d'accumulation d'amidon dans les proplastides (Nos observations ont été réalisées en fin de période obscure : 15 heures).

c) cals photomixotrophes:

L'examen d'une cellule en fin de phase sombre révèle la présence des organites cellulaires caractéristiques d'une jeune cellule végétale photoautotrophe, viable et fonctionnelle:

Il est possible de distinguer nettement : (Planche n° 6- photo A; planche n° 3 - photo 1)

- noyau et nucléole

- vacuole

- chloroplastes fonctionnels (Planche n° 7- photo B)

On notera la présence de thylakoïdes parfaitement différenciés et de granules lipidiques, vraisemblablement impliqués dans le renouvellement du système lamellaire. La double membrane plastidiale est nettement visible (Planche n° 4- photo 3).

- mitochondries

- reticulum endoplasmique (Planche n° 6- photo B)

3) Conclusion:

L'observation révèle une cellule végétale parfaitement fonctionnelle, lieu de synthèses actives, présentant des organites totalement différenciés .

Notre matériel végétal, sous forme de cal, semble donc, au vue de sa structure subcellulaire, apte à une croissance autotrophe.

Cette hypothèse demande à être confirmée par l'observation microscopique des cultures cellulaires issues des cals de proliférations analysés dans la présente étude.

CONCLUSION GENERALE

	SUSPENSION HETEROTROPHE EN FIOLES	SUSPENSION PHOTOMIXOTROPHE EN FIOLES	SUSPENSION HETEROTROPHE EN BIOREACTEUR	SUSPENSION PHOTOMIXOTROPHE EN BIOREACTEUR
Taux de croissance (μ)	0,14	0,24	0,16	0,14
Temps de doublement (jour)	5	3	4,5	5
Productivité en biomasse (g. PMS . jour ⁻¹ . litre ⁻¹)	0,95	0,55	0,7	0,53
Intensité respiratoire maximale à l'obscurité (μ moles O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹ PMS)	138	290	120	380
Intensité photosynthétique maximale (μ moles O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹ PMS)	-	90	-	40
Chlorophylles totales (μ g.g ⁻¹ PMS)	-	1,1	-	0,7
Rendement de conversion du saccharose (%)	44	60	47	36
Protéines solubles (mg. g ⁻¹ PMF)	2,35	1,75	2	1,5
Vitesse de consommation du nitrate (μ moles . jour ⁻¹ . g ⁻¹ PMF)	5,4	7,5	25,7	23,8
Vitesse de consommation de l'ammonium (μ moles . jour ⁻¹ . g ⁻¹ PMF)	4,4	6,6	12,9	30,7
Vitesse de consommation des sulfates (μ moles . jour ⁻¹ . g ⁻¹ PMF)	1,2	1	1,5	3,4
Activité Nitrate Réductase maximale (μ moles NO ₂ . h ⁻¹ . mg ⁻¹ prot.)	0,48	0,78	0,62	2
Activité Glutamine Synthétase maximale (μ moles GH. h ⁻¹ . mg ⁻¹ prot.)	1,15	4,2	-	-
Activité Rubisco maximale (μ moles CO ₂ . h ⁻¹ . mg ⁻¹ prot.)	2,25	0,35	N.D.	2,5
Activité PEP Case maximale (μ moles CO ₂ . h ⁻¹ . mg ⁻¹ prot.)	20	7,5	14	4

Tableau n° 12 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU METABOLISME PRIMAIRE

CONCLUSION GENERALE

Nota : Les grandes lignes de la discussion de nos résultats figurent à la fin de chaque chapitre de la partie "Résultats & Discussions". Elles ne seront que partiellement reprises dans cette conclusion générale, qui se doit d'être avant tout un bilan synthétique de notre travail.

La présente étude nous a conduit à réaliser la première mise en culture *in vitro* d'une plante médicinale tropicale - *Abrus precatorius* L. largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, et à assurer sa micropropagation au sein d'une large vitrothèque.

Cette approche s'inscrit parfaitement dans le cadre du programme de valorisation biotechnologique des plantes médicinales tropicales mené à l'ORSTOM depuis 1985.

Au terme de cette étude, nous avons partiellement caractérisé le métabolisme primaire de suspensions cellulaires photohétérotrophes et photomixotrophes d'*Abrus precatorius* L., cultivées en fioles d'Erlen meyer et en bioréacteur.

Notre travail a porté sur le suivi de près de vingt paramètres en cours de culture. Exploité synthétiquement avec les données établies par I. HARDY-CLARIS, il constitue une somme d'informations rarement obtenues concernant la physiologie et la biochimie d'une même culture cellulaire.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence des différences importantes dans le métabolisme des populations cellulaires, en fonction de leur comportement photosynthétique, mais aussi de la nature de la technique de culture utilisée (fioles agitées ou bioréacteur expérimental)

Ces comportements différents ont pu être mis en évidence au niveau de la croissance, de la consommation en nutriments minéraux, des activités enzymatiques fondamentales.

A) Influence du transfert fiole/réacteur agité et aéré:

1) croissance et échanges gazeux:

Quel que soit le type de cellules (hétéro- ou photomixotrophe), le transfert de la suspension des fioles en milieu confiné vers un bioréacteur aéré et agité influe négativement sur la productivité en biomasse des cellules. Le rendement de conversion du saccharose passe, dans les suspensions mixotrophes, de 60 à 36% lors du transfert.

L'intensité respiratoire maximale augmente lors du passage fioles/réacteur dans les suspensions mixotrophes; elle reste quasiment inchangée pour les suspensions hétérotrophes

2) nutrition minérale:

Le passage en bioréacteur induit des différences considérables sur la vitesse de consommation des composés minéraux. Ces vitesses sont alors multipliées d'un facteur de 3 à 5 suivant les éléments.

Par ailleurs, l'activité nitrate réductase des cellules est nettement plus forte (x 2,5 pour les cellules mixotrophes) dans les cultures en bioréacteurs.

3) activités carboxylases & photosynthèse :

D'une manière générale, l'activité PEPc diminue (-40% environ) lors du transfert fiole -bioréacteur, alors que l'activité Rubisco des cellules photomixotrophes augmente. Il est difficile de proposer un modèle cohérent pour l'impact de la culture en réacteur sur l'activité photosynthétique. En effet, on note une baisse de l'intensité photosynthétique maximale, alors que l'activité Rubisco augmente lors du transfert.

Lorsqu'on considère l'évolution générale des indicateurs du métabolisme primaire que nous avons retenus, le passage en bioréacteur agité se traduit le plus souvent par une altération du métabolisme. Cette fragilisation de la lignée peut s'expliquer par la modification brutale des conditions de culture (aération et agitation) infligée à la population cellulaire. En effet, la culture en réacteur s'effectue sous agitation magnétique, dans une atmosphère gazeuse constamment renouvelée.

Cependant, les vitesses de consommation en éléments minéraux, l'activité nitrate réductase, sont plus importants dans les cultures en réacteur. L'effet de l'oxygène sur l'activation des enzymes mises en jeu dans l'incorporation des nutriments minéraux (NR notamment) peut être alors mis en cause.

B) Comparaison entre lignées hétérotrophes et photomixotrophes:

1) Croissance et échanges gazeux:

Les cultures photomixotrophes montrent un métabolisme primaire plus actif que les cellules hétérotrophes. Cette différence est surtout visible dans les cultures en fioles, dans lesquelles le taux de croissance, l'intensité respiratoire, le rendement de conversion du saccharose sont supérieurs.

Dans les cultures en réacteurs, cette différence est moins marquée; il semble que la pression imposée par les conditions de culture soit assez importante pour amoindrir les différences de comportement liées à la nature hétéro ou mixotrophe des cellules.

2) Nutrition minérale:

Les différences mises en évidence au niveau des paramètres de croissance se retrouvent pour la nutrition minérale: les cellules photomixotrophes présentent des vitesses de consommation pour tous les ions toujours supérieures; excepté pour les sulfates où elles sont comparables.

En ce qui concerne les enzymes impliquées dans la nutrition azotée, les activités NR et GS sont plus importantes dans les cellules photomixotrophes. L'assimilation des éléments minéraux semble donc plus efficace dans ce type de culture.

On peut supposer que l'apport de lumière joue un rôle important sur les enzymes responsables de l'incorporation des nutriments minéraux (NR, GS, AMP Sulfurylase).

3) Activités carboxylases :

Les cellules hétérotrophes montrent une activité PEPc plus importante, signe d'une fixation anaplerotique du CO_2 plus intense.

En ce qui concerne la Rubisco, la faible activité maximale mesurée dans les cultures photomixotrophes en fioles demande à être confirmée; en effet, elle pourrait être expliquée par une erreur de mesure (vraisemblablement une dégradation partielle du Ribulose biphosphate en cours de conservation).

Une activité Rubisco est décelable dans les suspensions hétérotrophes; les détections immunologiques nous ont permis de mettre en évidence la présence de l'enzyme tout au long de la culture.

Ce résultat confirme la nature réversible de notre système hétérotrophe, obtenu par culture de lignées initialement mixotrophes à l'obscurité et en présence de fortes concentrations en saccharose,

Dans tous les types de cultures, la cinétique d'apparition des différentes activités enzymatiques suit le même schéma: Carboxylases et Nitrate Réductase montrent un pic d'activité en début de phase exponentielle, alors que pour la Glutamine Synthétase, ce pic apparaît plus tardivement.

Cette incorporation de l'ammonium plus tardive peut sembler en contradiction avec les résultats exposés par SALSAC *et al.* (1987). En effet, ces auteurs montrent que l'incorporation d'un ammonium est beaucoup plus économe en énergie que celle d'un ion nitrate *via* la voie nitrate et nitrite réductase. (5 ATP pour un NH_4 , au lieu de 15-16 ATP par NO_3 assimilé).

Or, sur notre matériel végétal, les deux voies d'incorporation interviennent simultanément. On ne peut donc pas parler, comme l'on fait bon nombre d'auteurs pour d'autres cultures cellulaires en nutrition mixte, d'assimilation préférentielle de l'ion ammonium par rapport au nitrate. Une étude globale de l'ensemble des systèmes enzymatiques permettrait, sans doute d'éclaircir ce point; la mesure de la seule activité GS ne donnant qu'une vision partielle des phénomènes d'assimilation, de l'ammonium.

Les différents types de cultures cellulaires étudiés sont capables de réaliser, grâce à un équipement enzymatique parfaitement fonctionnel, les grandes fonctions métaboliques décrites chez la plante entière: fixation du CO_2 , assimilation de l'azote sous ses formes réduites et oxydées.... La néosynthèse et l'expression de ces systèmes enzymatiques sont régulées par les conditions de l'environnement cellulaire, et le type de culture mis en oeuvre.

Les premières électrophorèses en gel d'amidon que nous avons pu réaliser pour quatre systèmes enzymatiques (PAC, GOT, GDH, PEROX) ont mis en évidence, dans la plupart des cas une identité des isoformes fonctionnelles tout au long de la culture

Il nous a été possible, grâce à l'utilisation de réactifs immuno-enzymologiques, de mettre en évidence des phénomènes de néosynthèse précoce lors du transfert des cellules sur un milieu neuf. La synthèse *de novo* de la Nitrate Réductase & de la Rubisco a ainsi pu être démontrée sur notre matériel. L'obtention prochaine d'anticorps polyclonaux anti PEPc et anti- GS nous permettra d'effectuer un travail semblable sur ces deux enzymes.

Enfin, et surtout, nous nous sommes employés, au cours de cette étude, à mettre au point et à adapter aux cultures cellulaires *in vitro* un ensemble cohérent de méthodes d'analyse simples et performantes: Dosage des nutriments minéraux extra & intra cellulaires, dosage des pigments chlorophylliens, mesure des activités spécifiques: nitrate réductase, glutamine synthétase, Rubisco, PEP case.

Les cultures cellulaires d'*Abrus*, ont, à cet égard, pleinement joué leur rôle de système-modèle: nous avons pu obtenir des cultures cellulaires à croissance rapide, hautement chlorophylliennes, fournissant une biomasse abondante.

A partir de ce matériel de choix, la majorité des méthodologies appropriées sont d'ores et déjà appliquées, à d'autres végétaux mis en culture *in vitro* dans notre Laboratoire: *Tephrosia vogelii*, *Catharanthus roseus* ...

Elles interviendront utilement lors de la mise en valeur de plantes médicinales porteuses d'importants intérêts économiques.

A notre grand regret, il ne nous a pas été possible de corrélérer nos résultats acquis sur

le métabolisme primaire des cellules, à la production de triterpènes décrite dans la littérature. Au vu des résultats acquis au Laboratoire, le composé extrait de feuilles et de cultures *in vitro* d'*Abrus precatorius* ne correspond pas à la glycyrrhizine.

L'identification de cette molécule est en cours de réalisation, à l'aide de techniques plus performantes (Chromatographie en Phase Gazeuse, Résonnance Magnétique Nucléaire...), en collaboration avec l'USTL et la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

La purification et la caractérisation immunologiques de systèmes enzymatiques-charnières, impliqués dans le métabolisme secondaire constituera un outil important dans l'étude des voies de biosynthèse de métabolites à haute valeur ajoutée.

C'est le cas de la Phénylalanine Ammonia Lyase (P.A.L.), enzyme-clef de la synthèse de roténoïdes (flavonoïdes à activité insecticide), chez *Tephrosia vogelii* (Leguminosae). De même, chez *Catharanthus roseus*, la production d'un alcaloïde antitumoral à partir de deux monomères indoliques, est sous le contrôle d'un système enzymatique dont il importe de connaître la régulation.

Les premiers résultats obtenus en immunoenzymologie constituent un préliminaire important aux futures expérimentations visant à quantifier les systèmes enzymatiques étudiés au cours de ce travail. La compatibilité de notre matériel végétal avec les anticorps produits au LSMP Orsay nous permet d'envisager, à très court terme la mise au point de dosages de type ELISA pour la nitrate réductase et les carboxylases (PEPc & Rubisco).

En outre, les récentes techniques de Biologie Moléculaire (sondes nucléiques) pourront nous permettre de caractériser plus précisément les phénomènes de dérepression génomique liés à des modifications de l'environnement cellulaire (présence d'inducteurs ou d'éliciteurs, stress physiologiques).

Les récents résultats obtenus par différentes équipes dans le monde, notamment sur la Nitrate Réductase, laissent entrevoir d'importantes perspectives (CHENG *et al.* - 1987, CALZA *et al.* 1988).

Ces études ne peuvent être le fait que d'équipes pluridisciplinaires, bien équipées, et maîtrisant un savoir-faire considérable.

Les collaborations en ce domaine, mises en place au cours de la présente étude, prendront alors toute leur valeur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- ABSAR N. & G. FUNATSU (1984): Purification and characterization of *Abrus precatorius* L agglutinin. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. ; 2(3): 102-115.
- ADJANOHOOUN E.J., L. AKE ASSI, J.J. FLORET, S. GUINKO, M. KOUMARE, A.M.R. AHYI & J. RAYNAL (1980): Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. Rapport ACCT. Agence de coopération culturelle et technique. Paris. 291 pages.
- AGIER C., F. BISTER-MIEL & J.L. GUIGNARD (1983): Etude de la vitesse moyenne de croissance d'une suspension cellulaire de *Silene alba* : influence des macroéléments du milieu de culture. Bull. Soc. Bot. Fr., 130, Lettres Bot.:4/5: 291-300.
- AKE ASSI L. (1983) : Santé et valorisation des plantes médicinales en Côte d'Ivoire. Bothalia; 14 (3&4): 603-605.
- ALTMAN A., Y. GULSEN, & R. GOREN (1982) : Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants *in vitro*. Plant Physiol. ; 69; 1-6.
- ANKINLOYE B.A. & L.A. ANDALUMO (1980): *Abrus precatorius* leaves: A source of glycyrrhizin. Nigerian J. Pharm.; 11: 250.
- ARNISON P.G. & W.G. BOLL (1974) : Isoenzymes in cell cultures of bush beans (*Phaseolus vulgaris* cv Contender): isoenzymatic changes during the callus culture cycle and differences between stock cultures. Can. J. Bot.; 52; 2621-2629.
- ARREGUIN B. & J.M. BONNER (1950) : The biochemistry of rubber formation in the guayule. II: Rubber formation on aseptic tissue culture. Arch. Biochem.; 26; 178-186.
- ASHIHARA H. & T. UKAJI (1986): Inorganic phosphate absorption and its effect on the adenosine 5'-triphosphate level in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol. ; 124: 77-85.
- ASLAM M., A. OAKS & R.C. HUFFAKER (1976): Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. Plant Physiol.; 58: 588-591.
- ASLAM M., R.C. HUFFAKER & R.L. TRAVIS (1973): The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate reductase activity. Plant Physiol. ; 52: 137-141.
- BACCOU J.C., Y. SAUVAIRE, A. RIVAL, P. TRISONTHI, & R. JONARD (1983) : Mise en évidence de l'identité structurale des saponines et sapogénines stéroïdiques du fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.) produites par des suspensions cellulaires cultivées *in vitro* et chez les plantes de plein champ. C.R. Acad. Sci. Paris, t.: 297, Série III, 449-452.
- BACH J.F. (1979): Réactions antigènes-anticorps : Introduction à la sérologie. in: Immunologie. 1100 p. Ed. Paris.

- BALAGUE C. & G. WILSON (1982): Growth and alkaloids biosynthesis by cells suspensions of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions. Physiol. Vég.; 20: 515.
- BANDURSKI R.S. (1955): Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphorylenolpyruvate and carbon dioxide. J. Biol. Chem. 217: 137-150.
- BARRAT (1980) : Method for the detection of glutamine synthetase on starch gels. Pl. Sci. Lett.; 18 : 249-255.
- BATT R.G. & W. WALLACE (1983): A comparison of the effect of trypsin and a maize root proteinase on nitrate reductase and other enzymes from maize. Biochem. Biophys. Acta; 744: 205-211.
- BAYLEY J.M., J. KING & O.L. GAMBORG (1972): The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures; Planta (Berl.); 105: 15-24.
- BECKER G. (1986): Plantes toxiques, Gründ Ed. , Paris: 16-17.
- BEEVERS L. & R.H. HAGEMAN (1972): The role of light in nitrate metabolism in higher plants. *in*: Photophysiology, Giese A.C. Ed., Academic Press, New York, London; VIII: 85-113.
- BEHREND J. & R.I. MATELES (1975) : Nitrogen metabolism in plant cell cultures . I. Effect of amino acids on growth. Plant Physiol. ; 56 : 584.
- BERGER R.G., F. DRAWERT, A. KINZKOFER, C. KUNZ & B.J. RADOLA (1985): Proteins and peroxidase in callus and suspension cultures of Apple. Plant Physiol. ; 77: 211-214.
- BERGMANN L. (1967): Wachstum grüner suspensions kulturen von *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" mit CO₂ als kohlenstoffquelle. Planta; 74: 243-249.
- BERLIN M.B. & I.ZELITCH (1975) : Photoautotrophic growth and photosynthesis in tobacco callus cells. Plant Physiol. ; 56 : 752-756.
- BERNT E. & H.U. BERGMAYER (1974): Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer H.U. Ed.; Vol.: 3 ; 1304-1307.
- BHARDWAJ D.K., M.S. BISHT & C.K. MEHTA (1980) : Flavonoids from *Abrus precatorius* . Phytochemistry ; 19 : 2040-2041.
- BHOJWANI S.S, V. DHAWAN & E.C. COCKING (1986): Plant tissue culture : A classified bibliography . Elsevier Ed., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo; 789 pages.
- BIESBOER D.D. & P.G. MAHLBERG (1979): The effect of medium modification and selected precursors on sterol production by short-term callus cultures of *Euphorbia tirucalli*. J. of Nat. Prod. ; 42(6): 648-657.
- BORNER T., R.R.MENDEL & J. SCHIEMAN (1986) : Nitrate reductase is not accumulated in chloroplast-ribosome deficient mutants of higher plants. Planta: 169; 202-207.
- BOUQUET A. & M. DEBRAY (1974): Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. ORSTOM. Travaux & Documents; 32: 135-137.
- BRADFORD M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.; 72: 248.

- BRADFORD J.A. & J.S. FLETCHER (1982): Influence of protein synthesis on NO_3^- reduction, NH_4^+ accumulation, and amide synthesis in suspension cultures of Paul Scarlet's rose. Plant Physiol.; 69: 63-66.
- BRANGEON J. & A. NATO (1981): Heterotrophic tobacco cell cultures during greening I. Chloroplast and cell development. Physiol. Plant.; 53: 327-334.
- BRASSART C., J. DUBOIS & R. BOURRIQUET (1978): Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause) C.R. Acad. Sci. Paris; 287 - Série D:1373- 1376
- BRASSART C., S. RAMBOUR & R. BOURRIQUET (1984): Activités glutamate déshydrogénase et glutamine synthétase d'une suspension cellulaire de *Silene alba* cultivée en présence de différentes sources d'azote. Physiol. Vég.; 22(6): 801-809.
- BROWN S.A. (1981) : Coumarins : in: The biochemistry of plants; Vol 7, Conn E.E. Ed. , Academic Press , NewYork, London; 269-300.
- BUREAU D. & J. DAUSSANT (1981): Immunoaffinity chromatography of proteins. A gentle and simple desorption procedure. J. Immunol. Methods; 41: 387-392.
- BUTENKO R.G., A. Kh. LIPSKY, N.D. CHERNIAK & H.C. ARYA (1984) : Changes in culture medium pH by cell suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. Pl. Sci. Lett.; 35 : 207-212.
- BUZCEK J. (1984): The occurrence of a nitrate reductase inactivating factor in extracts of *Spirodella polyrrhiza*. Acta Soc. Bot. Pol.; 53(3): 411-417.
- CALDAS R.A. & L.S. CALDAS (1976): Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul Scarlet's rose calluses. Physiol. Plant.; 37: 11-116.
- CALZA R., E. HUTTNER , M. VINCENTZ, P. ROUZE, F. GALANGAU, H. VAUCHERET, I. CHEREL, C. MEYER , J. KRONEMBERGER & M. CABOCHE (1987): Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductases from higher plants. Mol. Gen. Genet.; 209: 552-562.
- CAMPBELL W. H. (1986): Properties of Bromphenol blue as an electron donor for higher plant NADH: Nitrate Reductase. Plant Physiol.; 82:729-732.
- CAMPBELL W.H. & J. SMARELLI (1978): Purification and kinetics of higher plant nitrate reductase. Plant Physiol.; 61 : 611-616.
- CAMPBELL W.H. & J. SMARELLI (1986): Nitrate reductase: Biochemistry and regulation. in: Biochemical basis of plant breeding - Vol.2 - Nitrogen Metabolism. C.A. Neyra Ed., CRC Press, Boca Ranton, Florida.
- CAMPBELL W.H. (1987): Regulation of Nitrate Reductase in maize: An immunochemical approach. in: Inorganic Nitrogen Metabolism:99-103 Ullrich et coll. Eds. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- CAMPBELL W.H., D.J. DE GRACIA & E.R. CAMPBELL (1987): Regulation of Molybdenum cofactor of maize leaf. Phytochemistry; 26(8): 2149-2150.
- CAMPBELL W.H. & K.G. RIPP (1984): An ELISA for higher nitrate reductase. Ann. New York Acad. Sci.; 435: 123-125.

- CAMPBELL W.H. & J.L. REMMLER (1986): Regulation of corn leaf nitrate reductase: 1. Immunochemical methods for analysis of the enzyme's protein content. Plant Physiol.; 80: 435-441.
- CAMPBELL W.H., P. ZIEGLER, & E. BECK (1984): Development of nitrogen assimilation enzymes during photoautotrophic growth of *Chenopodium rubrum* suspension cultures. Plant Physiol. 74, 947-950.
- CAREW D.P. & E.J. STABA (1965) : Plant tissue culture : its fundamentals, applications and relationship to medicinal plant studies. Lloydia : 28; 1-26.
- CATT J.W & P. MILLARD (1988): The measurement of Ribulose 1,5 biphosphate Carboxylase/oxygenase concentration in the leaves of potato plants by Enzyme Linked Immunosorbant Assay. J. of Exp. Bot.; 39(199): 157-164.
- CHAGVARDIEFF P., M. PEAND, P. CARRIER & B. DIMON (1988): Oxygen exchange during growth of photomixotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. . Plant Cell, Tissue and Organ culture.; 12 : 243-251.
- CHAUMONT D. & C. GUDIN (1985): Transition from photomixotrophic to photoautotrophic growth of *Asparagus officinalis* in suspension culture. Biomass; 8: 41-45.
- CHENG C.L., J. DEWDNEY, A. KLEINHOFES & H.M. GOODMAN (1986): Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 83: 6825-6831.
- CHENG C.L. , J. DEWDNEY , H.G. NAM, B.G.W. DEN BOER & H.M. GOODMAN (1988): A new locus (NIA 1) in *Arabidopsis thaliana* encoding nitrate reductase. EMBO J.; 7(11): 3309-3314.
- CHEREL I., J. GROSCLAUDE & P. ROUZE (1985): Monoclonal antibodies identify multiple epitopes on maize leaf nitrate reductase. Biochem. Biophys. Res. Comm.; 129: 686-693.
- CHONKEL A. (1985): A propos de quelques graines toxiques existant à la Guadeloupe. Thèse de Docteur en Pharmacie . Université de Montpellier I; 15-27.
- CLARKSON D.T. & J.B. HANSON (1980): The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol.; 31: 239-298.
- COCUCCI M.C. & S. DELLA ROSA (1980) : Effects of canavanin on IAA and fusaric acid-stimulated cell enlargement, proton extrusion and potassium uptake in maize coleoptile. Physiol. Plant.; 48 : 239-242.
- COLLATZ S.J., M. BADGER, C. SMITH & J.A.BERRY (1979): A radioimmune assay for RuP₂ carboxylase protein. Carnegie Institution Year Book; 78: 171-175.
- COPPING L.G. & H.E. STREET (1972): Properties of the invertases of cultured Sycamore cells and changes in their activity during culture growth. Physiol. Plant.; 26: 346-354.
- CRAWFORD N.G., W.H. CAMPBELL & R.W. DAVIS (1986): Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 83: 8073-8076.
- CSEPLE A. & P. MEDGYESY (1986): Characteristic symptoms of photosynthesis inhibition by herbicides are expressed in photomixotrophic tissue culture of *Nicotiana*. Planta; 168: 24-28.
- CURTIS L.T. & J. SMARELLI (1987): Metabolite control of nitrate reductase activity in cultured soybean cells. J. Plant Physiol.; 127: 31-39

- DALTON C.C. (1980): Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: Photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. J. of Exp. Bot.; 31(122):791-804.
- DALTON C.C. & E. PEEL (1983): Product formation and plant cell specialization: A case study of photosynthetic development in plant cell cultures. Prog. Ind. Microbiol.; 17: 109-166.
- DALTON C.C. & H.E. STREET (1976) : The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension culture of spinach (*Spinacia oleracea* L.) . In vitro; 12: 485-494.
- DALTON C.C. & H.E. STREET (1977): The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacia oleracea* L.) cells. Pl. Sci. Lett.; 10 : 157-164.
- DALTON C.C., K. IQBAL & D.A. TURNER (1983): Iron phosphate precipitation in Murashige & Skoog media . Physiol. Plant.; 57: 472-476.
- DAILEY F.A., T. KUO, & R.L. WARNER (1982); Pyridine nucleotide specificity of barley nitrate reductase. Plant Physiol.; 69: 1196-1199.
- DAUSSANT J. & A. SKAKOUN (1985): Les méthodes immunochimiques appliquées à l'analyse des protéines végétales. in : Protéines végétales. B. Godon Ed., Technique et documentation APRIA, Lavoisier, Paris 81-112.
- DAVEY M.R., M. FOWLER & H.E. STREET (1971): Cells clones contrasted in growth, morphology and pigmentation isolated from a callus culture of *Atropa belladonna* var. Lutea. Phytochemistry; 10: 2555-2575.
- DAVIES D.D. (1973): Control of and by pH. Symp. Soc. Exp. Biol.; 27 : 513.
- DAVIES D.D. (1979): The central role of Phosphoenolpyruvate in plant metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol.; 30 : 131-158.
- DE EKNAMKUL W. & B.E. ELLIS (1985) : Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*, Plant Cell Reports 4: 46-49..
- DE KLERK-KIEBERT Y.M. & L.H.W. VAN DER PLAS (1984): The course of adenine nucleotide contents in white and green soybean cells during growth in batch suspension cultures. Pl. Sci. Lett.; 33 : 155-162.
- DE VIENNE D. (1983) : La glutamate déshydrogénase de la luzerne : aspects cytologiques, structuraux et évolutifs. Can. J. Genet. Cytol.; 25 : 146-160.
- DEISING H. & H. RUDOLF (1987): Nitrate-induced *de novo* synthesis and regulation of NAD(P)H nitrate reductase from *Sphagnum*. Physiol. Plant.; 71: 477-482.
- DEROCHE M.E. (1983) : Relations entre la photosynthèse et l'assimilation de l'azote. Bull. Soc. Bot. Fr.; 130 : 85-98.
- DEUS B. & M.H. ZENK (1982): Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. Biotechnol. & Bioeng.; 24: 1965-1974.
- DOUGALL D.K. (1974): Evidence for the presence of Glutamate Synthase in extracts of carrot cell cultures. Biochem. Biophys. Res. Comm.; 58: 639-646.
- DOUGALL D.K. (1980): Nutrition & metabolism. in: Plant tissue culture as a source of biochemicals, E. J. Staba Ed. CRC Press, Boca Raton , Florida.; 21-58.

- DUBOIS J. (1975) : Analyse quantitative de la croissance d'une culture de cellules du *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. Bull. Soc. bot. Fr ; 122: 269-280.
- DUBOIS J. (1980) : Composés sulfhydryles et croissance de tissus isolés de carotte (*Daucus carotta* L.) et de suspensions cellulaires de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause) . Thèse Doct. Etat, Université de Lille.
- DUBOIS J., S. RAMBOUR & J. VASSEUR (1976): Croissance d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. KRAUSE) et évolution des acides nucléiques. Actes du 101° Congrès national des Sociétés savantes , Lille ; fasc. I: 441-454.
- DUKE S.H. & S.O. DUKE (1984) : Light control of extractible nitrate reductase in higher plants. Physiol Plant ; 62 : 485-493.
- DURANTON H., R. SCHANTZ & J.G. KIENTS (1964) : Influence des glucides sur la synthèse de chlorophylle chez des explants calibrés de topinambour cultivés *in vitro*. Bull. Soc. Franc. de Physiol. Vég. ; 10 : 186-194.
- DYER T.A. (1985): The chloroplast genome and its products. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology; 2: 147-177.
- EDELMAN J. & HANSON A.D. (1971): Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures . Planta; 98: 150-156.
- EDELMAN J. & HANSON A.D. (1972): Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot tissue cultures . The effect of composition of the culture medium. J. Exp. Bot. ; 23: 469-478.
- ELLIS B. (1982): Cell-to -cell variability in secondary metabolites production within cultured plant cell populations. Plant tissue culture 1982. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Fujiwara Ed. : 395-396
- ELLIOTT W.H. (1953): Isolation of Glutamine Synthetase and Glutamotransferase from green peas. J. of Biol. Chem.; 201: 661-672.
- ENGVILD K.C. (1974): Growth and plating of cell suspension culture of *Datura innoxica*. Physiol. Plant; 32: 390-393.
- ERIKSSON T. (1965): Studies on the growth requirements and growth measurements of Cell cultures of *Haplopappus gracilis*; Physiol. Plant; 18 : 976-993.
- EVANS H.J. & A. NASON (1953): Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiol. ; 28 : 233-254.
- FASEKAS DE ST. GROTH S. & D. SCHEIDEGGER. (1980): Production of monoclonal antibodies: strategies and tactics. J. of Immunol. Meth.; 35: 1-21.
- FERRARI T.E., O.C. YODER & P. FILNER (1973) : Anaerobic production by plant cells and tissues : evidence for two nitrate pools. Plant Physiol.; 70 : 410-413.
- FERRARIO S., B. HIREL, & P. GADAL (1983): Immunochemical characterization of nitrate reductase from spinach leaves and roots. Biochem. Biophys. Res. Comm.; 113: 733-737.
- FILNER P. (1965): Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells . Biochem. Biophys. Acta; 118: 299-310.

- FIDO R.J. (1987): Purification of Nitrate Reductase from spinach (*Spinacea oleracea* L.) by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. Plant Science; 50: 111-115.
- FOUGEREAU M. (1985): L'Immunologie. Coll. "Que sais-je?". n° 1358. Presses Universitaires de France. Paris. 127 p.
- FOWLER M.W. & R.D.J. BARKER (1979): Assimilation of ammonium in non-chlorophyllous tissue. in: Nitrogen assimilation of plants, E.J. Hewitt & C.V. Cutting Ed., Academic Press, London: 489-499.
- FRIEDRICH J.W. and R.C. HUFFAKER (1980): Photosynthesis, leaf resistances and ribulose 1,5 biphosphate carboxylase in senescing barley leaves. Plant Physiol.; 65: 1103-1107.
- FROMAGEOT P. (1963): Dosage des différentes formes du soufre dans les milieux biologiques. in LOISELEUR : Techniques de Laboratoire. Masson Ed. Paris; Tome I, fasc. 2: 1000-1016.
- GALFRE G. & C. MILSTEIN (1981) : Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. in: Methods in Enzymology, 73 B, Immunological techniques, Langone J.J. & H.V. Vunakis Ed., Academic Press, New York; 3-46.
- GALLE F. (1988): Initiation à des techniques de culture *in vitro*. au Laboratoire de Physiologie & Biotechnologie Végétales . ORSTOM . Centre d'Adiopodoumé . Côte d'Ivoire. Mémoire de Maîtrise de Biologie Cellulaire . Université de Poitiers, 19 pages.
- GAMBORG O.L., R.A. MILLER & K.OJIMA (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res.; 50 : 151.
- GAMBORG O.L. & EVELEIGH D.E. (1968): Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. Can. J. Biochem.; 46 : 417-421.
- GAMBORG O.L. & J.P. SHYLUK (1970): The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. Plant Physiol.; 45: 598-600.
- GASPAR T., R. GOREN, M. HUBERMAN & M. DUBUCQ (1978): Citrus leaf abscission . regulatory role of exogenous auxin and ethylene on peroxidases and endogenous growth substances. Plant Cell Environ.; 1 : 225-230.
- GAUTHERET R.J. (1934): Culture de tissu cambial. C.R. Acad. Sc. Paris; 198, Série D: 2195-2196.
- GAUTHERET R.J. (1939): Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie de tissus de tubercule de carotte. C.R. Acad. Sc. Paris, Serie D; 208: 118-121.
- GAUTHERET R.J. (1959): La culture des tissus végétaux. Masson Ed. Paris. 863 p.
- GHOSAL S. & S.K. DUTTA (1971) : Alkaloids of *Abrus precatorius*. Phytochemistry; 10: 195-198.
- GIVAN C.V. (1979): Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochemistry ; 18: 375-382.
- GIVAN C.V. & H.A. COLLIN (1967): Studies on the growth and in culture of plant cells. II Changes in respiration rate and nitrogen content associated with the growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspension culture. J. Exp. Bot. ; 18: 321-331.
- GRANDSTEDT R.C. & R.C. HUFFAKER (1982): Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. Plant Physiol.; 70 : 410-413.

- GRAF L., B. NOTTON & E.J. HEWITT (1975): Serological estimation of spinach nitrate reductase. Phytochemistry; 14: 1241- 1243.
- GREEN (1983): The effect of potassium and calcium on cotyledon expansion and ethylene evolution induced by cytokinins. Physiol. Plant. ; 57 : 57-61.
- GRUMBACH K.H. & T.J. BACH (1979): The effect of PSII herbicides, Amitrol and SAN 6706 on the activity of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A-reductase and the incorporation of (2-¹⁴C) acetate and (2-³H) mevalonate into chloroplast pigments of radish seedlings. Z. Naturforsch.; 34c: 941-943.
- GRUMBACH K.H. & B. FORN (1980): Chloroplast autonomy in Acetyl-Coenzyme-A formation and terpenoid biosynthesis. Z. Naturforsch.; 35c: 645-648.
- GUERRERO M.G., J.M. VEGA & M. LOSADA (1981) : The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. Ann Rev. Plant Physiol. ; 254: 169-1475.
- GUIGNARD J.L., L. COSSON & M. HENRY (1985): Abrégé de phytochimie. Masson Ed. Paris; 39.
- GUIZ (1979): Contribution à l'étude des enzymes du métabolisme azoté chez *Phaseolus vulgaris*. Thèse de Doctorat de 3^e Cycle, Université de Nancy I.
- GUIZ C., HIREL B., SHEDLOVSKI G. & GADAL P. (1979): Occurrence and influence of light on the relative proportions of two Glutamine Synthetase in rice leaves. Plant Sci. Lett.; 15: 272-277.
- HABERLANDT G. (1902): Culturversuche mit isolierten Pflanzellen. Sitz. Akad. Wiss. Wien. ; 111: 69-92.
- HAGEMAN R.H., C.F. CRESWELL and E.J. HEWITT (1962): Reduction of nitrate, nitrite, and hydroxylamine to ammonia by enzymes extracted from higher plants . Nature;193: 247-250.
- HAGEMAN R.H. & P. HUCKLESBY (1971) : Nitrate Reductase from higher plants . Methods in Enzymol. ; 23, 491-503.
- HAGIMORI M., T. MATSUMOTO & Y. OBI (1982): Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. III Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown on liquid media. Plant & Cell Physiol.; 23(7): 1205-1211.
- HAGIMORI M., T. MATSUMOTO, & Y. MIKAMI (1984): Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. Plant & Cell Physiol. ; 25(6): 1099-1102.
- HALLER E, M. SUTER & C. BRUNOLD (1986) : Regulation of ATP sulfurhyalase and Adenosine 5'-phospho-sulfate sulfotransferase by the sulfur and the nitrogen source in heterotrophic cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. J. Plant Physiol.; 125 :275-283.
- HARDY T. (1984): Culture *in vitro* d'*Euphorbia characias*: Obtention & étude d'une souche photoautotrophique. Thèse de Docteur-Ingénieur . Université de Paris VI. 104 pages.
- HARDY T. , D. CHAUMONT, L. BRUNEL & C. GUDIN (1987): Photoautotrophic suspension cultures: I. Obtention of photoautotrophic cultures from *Euphorbia characias* L. J. Plant Physiol. ; 128: 11-19.

- HARDY-CLARIS I. (1988): Obtention & études physiologique et biochimique de suspensions photomixotrophe et hétérotrophe d'*Abrus precatorius*. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal. Clermont Ferrand II. N° d'ordre: 139. 152 pages.
- HEDLEY C.L. & A.O. ROWLAND (1975): Changes in the activity of some respiratory and photosynthetic enzymes during the early leaf development of *Antirrhinum majus* L. Plant Sci. Lett.; 5: 119-126.
- HENSHAW G.G., K.K. JHA, A.R. MEHTA, D. JOAN SHAKESHAFT & H.E. STREET (1965) : Studies on the growth in culture of plant cells: I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. J. of Exp. Bot.; 17 (51) : 362-377.
- HEIMER Y.M. & P. FILNER (1970): Regulation of nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. II: Properties of a variant cell line. Biochem. Biophys. Acta; 215: 152-165.
- HELLER R. (1953): Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Bot.; 14: 1-223.
- HENRY M., C. AGIER & F. BISTER-MIEL (1981): Obtention et croissance *in vitro* d'une suspension cellulaire du *Saponaria ocymoides* L. Rev. Cytol. Biol. végét. - Bot.; 4: 295-309.
- HERZBECK H. & W. HUSEMANN (1985): Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum* L. in: Primary & secondary metabolism of plant cell cultures; Neumann & all. Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- HEWITT E.J. (1975): Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Ann. Rev. Plant Physiol.; 26 : 73-100.
- HEWITT E.J. & B.A. NOTTON (1980): Nitrate reductase systems in eucaryotic and procaryotic organisms . in : Molybdenum and molybdenum-containing enzymes , Coughlan Ed., Pergamon Press.
- HILL H.M. & L.J. ROGERS (1974) : Mevalonate activating enzymes and phosphatases in higher plants. Phytochemistry; 13: 763-777.
- HIREL B. (1984): Les isoenzymes de la glutamine synthetase chez les angiospermes. Thèse de Docteur d'Etat ès Sciences Naturelles. Université de Paris-Sud . Centre d'Orsay. 143 pages
- HIREL B. & P. GADAL (1980): Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. Plant Physiol.; 66: 619-623.
- HIREL B., S. Mc NALLY, P. GADAL, N. SUMAR & G.R. STEWART (1984 a): Cytosolic glutamine synthetase in higher plants : A comparative immunological study. Eur. J. Biochem.; 138: 63-66.
- HIREL B., A. NATO & F. MARTIN (1984 b) : Glutamine synthetase in ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase deficient tobacco mutants in cell suspension culture. Plant Cell Reports; 3: 106-108.
- HOARAU J., B. HIREL & A. NATO (1986): New artificial electron donor for in vitro assay of Nitrate Reductase isolated from cultured tobacco cells and other organisms. Plant Physiol.; 80: 946-949.
- HUFFAKER R.C. (1982): Biochemistry and physiology of leaf proteins. in: Encyclopedia of Plant Physiology, 14A: 370-400. D. Boulter & B. Parthier Eds. Springer Verlag. Berlin.
- HUNTER W.M. (1978): Radioimmunoassay. in: Handbook of experimental immunology. 3rd Edition, Vol. 1: immunochemistry. Weir W.D.M. Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London: 14.1-14.40.

- HUSEMANN W. (1981) : Growth characteristics of hormone and vitamin independent photoautotrophic cell suspension culture from *Chenopodium rubrum*. Protoplasma ; 109 : 514-431.
- HUSEMANN W. (1982): Photoautotrophic growth of cell suspension cultures from *Chenopodium rubrum* in an airlift fermenter. Protoplasma; 113: 214-220.
- HUSEMANN W. (1985): Photoautotrophic growth of cells in culture. in: Cell culture & somatic cells genetics of plants. I.K. Vasil Ed., Academic Press. Chap.: 6: 213- 252.
- HUSEMANN W. & W. BARZ (1977) : Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension culture of *Chenopodium rubrum*. Physiol Plant. ; 40 : 77-81.
- HUSEMANN W., A. PLOHR, & W. BARZ (1979): Photosynthetic characteristics of photomixotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. Protoplasma; 100: 101-112.
- JACKSON P.C & C.E. HAGEN (1960) : Products of orthophosphate absorption by barley roots . Plant Physiol.; 35; 326-332.
- JACOBI B., S. ABAS & B. STEINITZ (1973) : Rubidium and potassium absorption by bean-leaf slices compared to sodium absorption . Physiol. Plant.; 28, 209-214.
- JOHANSON B.C. & H. GEST (1977): Adenylation-deadenylation control of the glutamine synthetase of *Rhodospseudomonas capsulata*. Eur J. Biochem.; 81: 365-371.
- JOLLY S.O, W. CAMPBELL and N.E. TOLBERT (1976): NADPH- and NADH nitrate reductase from soybean leaves. Arch. Biochem. Biophys.; 174: 431-439.
- JOLLY S.O. & N.E. TOLBERT (1978): NADH-Nitrate reductase inhibitor from soybean leaves . Plant Physiol.; 62: 197-203.
- JONES R.W., A.J. ABBOT, E.J. HEWITT, D.M. JAMES & G.R. BEST (1976): Nitrate reductase activity and growth in Paul Scarlet's rose in relation to nitrogen source and molybdenum. Planta; 133: 27-34.
- JONES R.W., A.J. ABBOTT, E.J. HEWITT, G.R. BEST & E.F. WATSON (1978): Nitrate reductase activity in Paul's Scarlet rose in suspension cultures and the differential role of nitrate and molybdenum in induction. Planta; 141: 183-189.
- JORDAN D.B. & J.S. FLETCHER (1980): Nitrate assimilation in suspension cultures of Paul Scarlet's rose. Can. J. Bot. ; 58: 1088-1094.
- JURD R.D. (1978): Immunoelectrophoresis. in: Gel electrophoresis of proteins: A practical approach.; 229-247. Hames & Rickwood Eds. I.R.L. Press.
- KAMACHI K., Y. AMEMIYA, N. OGURA & H. NAGAKAWA (1987): Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Plant Cell Physiol.; 28(2): 333-338.
- KANAMORI T. & H. MATSUMOTO (1972): Glutamine Synthetase from rice plant roots. Arch. Biochem. Biophys.; 125: 404-412.
- KATO A., S. KAWASOHE, M. IJIMA, & Y. SHIMIZU (1975): Continuous cultures of tobacco cells. J. Ferment Technol.; 54: 82.

- KATO A. & S. NAGAI (1979) : Eur. J. Appl. Microbiol.; 7: 219.
- KATOH K., M. ISHAKAWA, Y. MIYAKE, Y. OHTA, Y. HIROSE & T. IWAMURA (1980): Nutrient utilisation and requirement under photoautotrophic growth of *Marchantia polymorpha*. Improvement of culture medium. Physiol. Plant.; 49: 241-247.
- KENNIS J.D. & V.S. TRIPPI (1986) : Regulation of nitrate reductase in detached oat leaves by light and oxygen. Physiol. Plant.; 68 : 387-390.
- KERHARO J. & J.G. ADAM (1974): La Pharmacopée Sénégalaise traditionnelle ; 435-441. Vigot Frères Ed. Paris.
- KHERHARO J. & BOUQUET (1950) : Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire et de la Haute-Volta. Vigot Frères Ed. Paris.
- KING P.J. & H.E. STREET (1973) : Growth patterns in cell cultures . in: Plant tissue and cell culture: 269-337. Street H.E. ed., Bot. Monog. Vol: 11, Oxford - London- Edinburgh - Melbourne : Blackwell.
- KINGSBURY J.M. (1964): Poisonous plants of United States and Canada ; 303, Prentice-Hall , New Jersey, Eds.
- KLEINKHOFS A., K.R. NARA YANAN, D.A. SOMERS , T.M. KUO & R.L. WARNER (1986): Immunological methods for higher plant nitrate reductase. in: Immunology in Plant Science: 190-211. H.F. Linskens & J.F. Jacksons Eds. Springer-Verlag. Berlin
- KLEINKOPF G.E., R.C. HUFFAKER & A. MATHESON (1970): Light induced *de novo* synthesis of ribulose 1,5 -diphosphate carboxylase in greening leaves of barley. Plant Physiol.; 46: 416-418.
- KLEPPER L., D. FLESHER, & R. HAGEMAN (1971) : Generation of reduced nicotinamides adenine nucleotides for nitrate reduction in green leaves . Plant Physiol. , 48 : 580-590.
- KNOBLOCH K.H. (1982): Uptake of phosphate and its effect on phenylalanine ammonia lyase and cinnamoyl putrescines in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* . Plant Cell Rep. ; 1:128-130.
- KNOBLOCH K.H. & J. BERLIN (1980): Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G Don. Z. Naturforsch. ; 35 : 551.
- KNOBLOCH K.H., G. BEUTNAGEL & J. BERLIN (1981): Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension of *Nicotiana tabacum*. Planta; 153 : 582-585.
- KOHLER G. & C. MILSTEIN (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature; 256: 495-497.
- KOHLER G., C. MILSTEIN & A. JERNE (1984) in: L'Immunologie; 35-37 .Fougereau M. "Que sais-je?" n°1358. Presses Universitaires de France . Paris. 127 p.
- KOROLEFF L. (1970): Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. Cons. Int. Explor. Mer: Information on techniques and methods for sea water analysis. An interlaboratory report ; n°3.

- KRAMER S., R.V. HAGEMAN & K.V. RAJAGOPALAN (1984) : *In vitro* reconstitution of nitrate reductase activity of the *Neurospora crassa* mutant nit-1 : specific incorporation of molybdopterin. Arch. Biochem. Biophys.; 233: 821-829.
- KREBS H.A. (1935): Metabolism of amino-acids . IV. the synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissue. Biochem. J.; 29: 1951-1969.
- KRIKORIAN A.D. & D.L. BERQUAM (1969): Plant cell and tissue culture : The role of Haberlandt. Bot. Rev.; 35: 59-88.
- KUHN D.N., M. KNAUF & P. STUMPF (1981): Subcellular localization of Acetyl-CoA synthetase in leaf protoplasts of *Spinacea oleracea*. Arch. Biochem. Biophys.; 209(2): 441-450.
- KUO T.M., D.A. SOMERS, A. KLEINHOFs and R.L. WARNER (1982 a): NADH-nitrate reductase in barley leaves: identification and amino acid composition of subunit protein. Biochem. Biophys. Acta; 708:75-81.
- KUO T.M., R.L. WAGNER & A. KLEINHOFs (1982 b): *In vitro* stability of nitrate reductase from barley leaves. Phytochemistry; 21(3): 531-533.
- KUO T.M., A. KLEINHOFs, D.A. SOMMERS & R.L. WAGNER (1984): Nitrate reductase-deficient mutants in barley: Enzyme stability and peptide mapping. Phytochemistry; 23(2):229-232.
- KURZ W.G.W & F. CONSTABEL (1985): Aspects affecting biosynthesis and biotransformation of secondary metabolites in plant cell cultures. *in*: CRC Critical Reviews in Biotechnology; 2(2): 105-118.
- LAEMMLI U.K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London); 227: 680-685.
- LAMBERT N. (1989) : Etude comparative de la biosynthèse des roténoïdes par des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* Hook f. (Leguminosae). Essais d'optimisation de la production. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II .
- LANE M.D., H. MARYUAMA & R.L. EASTERDAY (1969): Phosphoenolpyruvate carboxylase from peanut cotyledons. Methods Enzymol.; 13: 277-283.
- LAURELL C.B. (1966): Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gels containing antibodies. Anal. Biochem.; 15:45.
- LEA P.J. & B.J. MIFLIN (1976): The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry; 15: 873-885.
- LEA P.J. & B.J. MIFLIN (1979): The assimilation of ammonium nitrogen by chlorophyllous tissue. *in*: Nitrogen assimilation of plants, E.J. Hewitt & C.V. Cutting Eds., academic Press, London.
- LECLERC J. (1965): Formulaire Pharmaceutique; 1383. Vigot Frères. Edit. , Paris.
- LEGUAY J.J. & J. GUERN (1977): Quantitative effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. Plant Physiol.; 60:265-270.
- LEONG C.C. & T.C. SHEN (1982): Occurrence of Nitrate Reductase inhibitor in rice plants Plant Physiol.; 70:1762-1763.

- LICHTENTALLER H.K. & A.R. WELLBURN (1983) : Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans., 603: 591-592.
- LIN W. (1981) : Inhibition of anion transport in corn root protoplasts. Plant Physiol.; 68 : 435-438.
- LINSMAIER E.M. & F. SKOOG (1965) : Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant.; 18: 100-126
- LORD J.M. (1987): The use of cytotoxic plant lectins in cancer therapy. Plant Physiol.; 85: 1-3.
- LOYOLA VARGAS V. & E. SANCHEZ DE JIMENEZ (1986) : Effect of nitrate, ammonium and glutamine, on nitrogen assimilating enzymes during callus growth of maize. J. Plant Physiol.; 125 : 235-242.
- LUPI A., F. DELLE MONACHE, G.B. MARINI-BETTOLO; D. LIMA BARROS COSTA & I LEONCIO D'ALBUQUERQUE (1979): Abruquinones: New natural isoflavanquinones. Gaz. Chim. Ital.; 109: 9-11.
- MANN A.F., D.P HUCKLESBY & E.J. HEWITT (1979): Effect of aerobic and anaerobic conditions on the *in vivo* nitrate reductase assay in spinach leaves. Planta; 146: 83-89.
- MARME (1983) : Calcium transport and function. in: Inorganic Plant Nutrition; A Lauchli & R.L. Bielecki Ed., Encycl. Plant Physiol. New Series Vol. 15B, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Mc CARTHY J.J., D. RATCLIFFE & H.E. STREET (1980): The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in batch cultures. J. Exp. Bot.; 31: 1315-1325.
- Mc KINNEY (1941) : Absorption of light by chlorophylls solutions. J. Biol. Chem.; 140 : 315-322.
- Mc NALLY S. & B. HIREL (1983): Glutamine synthetase isoforms in higher plants. Physiol. Vég.; 21(4): 761-774.
- Mc NALLY S., B. HIREL, P. GADAL, A.F. MANN & G.R. STEWART (1983 a): Glutamine synthetases of higher plants. Plant Physiol.; 72: 22,25.
- Mc NALLY S., T.O. OREBAMJO, B. HIREL & G.R. STEWART (1983 b): Glutamine Synthetase isoenzymes of *Striga hermontica* and other Angiosperm root parasites. J. of Exp. Bot.; 34 (142): 610-619.
- MAKI H., K. YAMAGISHI, T. SATO, N. OGURA & H. NAKAGAWA (1986): Regulation of Nitrate Reductase activity in cultured spinach cells as studied by an enzyme-linked immunorbant assay. Plant Physiol.; 82:739-741.
- MANCINI G., A.O. CARBONARA & J.F. HEREMANS (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry; 2: 235-254.
- MANDAVA N., J.M. ANDERSON & S.R. DUKTI (1974): Indole plant growth inhibitors from *Abrus precatorius* seeds. Phytochemistry; 13: 2853-2856.
- MARCHE-MARCHAND J. (1965): Le monde végétal en Afrique intertropicale; 325. Editions de l'Ecole. Paris.
- MARGARA J. (1978): Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture *in vitro*. C.R. Acad. Agric. Fr.; 8: 654-661.

- MARIGO G., H. BOUYSSOU & A.M. BOUDET (1986): Accumulation des ions nitrate et malate dans les cellules de *Catharanthus roseus* et incidence sur le pH vacuolaire. Physiol. Vég.; 24 (1): 15-23.
- MARIN B. (1986) : Plant vacuoles: Their importance in solute compartmentation in cells and their application in plant biotechnology. Plenum Press Ed., New York, London.
- MARTIN S.M. (1980) a : Mass culture systems for plant cell suspensions. *in*: Plant Tissue culture as a source of biochemicals. E.J. Staba Ed., CRC Press, Boca Ranton, Florida: 149-166.
- MARTIN S.M. (1980) b : Environmental factors: B. temperature, aeration and pH . *in*: Plant Tissue culture as a source of biochemicals. E.J. Staba Ed., CRC Press, Boca Ranton, Florida: 149-166.
- MARTIN S.M. & D. ROSE (1976) : Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. Can J. Bot.; 54 (11): 1264-1270.
- MATILE P. (1978) : Biochemistry and function of vacuoles. Ann. Rev. Plant Physiol.; 29 : 193-213.
- MATSUMOTO T., K. OKUNISHI, K. NISHIDA, M. NOGUCHI & E. TAMAKI (1971): Studies on the culture conditions of higher plant cells in suspension culture. II Effect of nutritional factors on the growth. Agric. Biol. Chem.; 35: 543-551.
- MAUREL B. & A. PAREILLEUX (1986) : Carbon dioxide fixation and growth of heterotrophic cell suspensions. J. Plant Physiol.; 122: 347-355.
- MENDEL R.R. & A.J. MULLER (1985): Repair *in vitro* of nitrate reductase-deficient tobacco mutants (cnxA) by molybdate and by molybdenum cofactor. Planta; 163: 370-375.
- MENGEL K. & E.A. KIRKBY (1987): Principles of Plant Nutrition. (4th Edition). International Potash Institute. Bern . 687 pages
- MERILLON J.M., J.C. CHENIEUX & M. RIDEAU (1983): Cinétique de croissance, évolution du métabolisme glucido-azoté et accumulation alcaloïdique dans une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus*. Planta Med.; 47: 169-176.
- MEYER C., I. CHEREL, T. MOUREAUX, J. HOAREAU, J. GABARD & P. ROUZE (1987): Bromphenol blue: nitrate reductase activity in *Nicotiana plumbaginifolia*. An immunochemical and genetic approach. Biochimie; 69:735-742.
- MIFLIN B.J. & P.J. LEA (1976): The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry; 15: 873-885.
- MIGINIAC-MASLOW M. , Y. MATHIEU, A. NATO & A. HOARAU: (1981): Contribution of photosynthesis to the growth and differentiation of cultured tobacco cells. The regulatory role of inorganic phosphate. *in*: Photosynthesis, Proc.Int. Cong., Akoyunoglou G. Ed., Balaban Int. Sci. Serv., Philadelphia Pa.; 5: 977-984.
- MIERENDORF R.C. & DIMOND R.L. (1983): Functional heterogeneity of monoclonal antibodies obtained using different screening assays. Anal. Biochem.; 135: 221-229.
- MILHET Y., F. FERRON & C. COSTES (1978): Quelques résultats sur la physiologie d'*Abrus precatorius* L. Plantes médicin. Phytothérapie; XII (2): 151-156.
- MIZIORKO H.M. & G.H. LORIMER (1983): Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase. Ann. Rev. of Biochem.; 52: 507-535.

- MOHANTY B. & J.S. FLETCHER (1978): Influence of ammonium on the growth and development of suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Physiol. Plant. ; 42: 221-225.
- MOHANTY B. & J.S. FLETCHER (1980): Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul Scarlet's rose. Physiol. Plant.; 48: 453-459.
- MUIR W.H., A.C. HILDEBRANDT & A.J. RIKER (1958): The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. Am. J. Bot.; 45: 589-597.
- MURASHIGE T. & F. SKOOG (1962): A revised medium for rapid growth and biomass assay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. ; 15: 473-497.
- MURATA M. & T.J. ORTON (1982): Analysis of karyotypic changes in suspension cultures of celery. Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. 435-436.
- MURILLO E. & E. SANCHEZ DE GIMENEZ (1984): Alternative pathways for ammonium assimilation in *Bouvardia ternifolia* cell suspension cultures. J. Plant Physiol. ; 117 : 57-68.
- NAKAGAWA H., Y. YONEMURA, H. YAMAMOTO, T. SATO, N. OGURA & R. SATO (1985): Spinach nitrate reductase: Purification, molecular weight, and subunit composition. Plant Physiol.; 77: 124-128.
- NASH D.T. & M.E. DAVIES (1972): Some aspects of growth and metabolism of Paul Scarlet's rose cell suspensions. J. of Exp. Bot.; 74 : 75-91.
- NASH D.T. & M.E. DAVIES (1975): Isoenzyme changes during the growth cycle of Paul Scarlet's rose cell suspension. Phytochemistry; 14 : 2113-2118
- NATO A. (1984) : Régulations structurales et fonctionnelles de l'équipement photosynthétique des cellules de *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi en culture *in vitro*. Thèse Doct. d'Etat, université de PARIS XI. 133 pages.
- NATO A., S. BAZETOUX & Y. MATHIEU (1977): Photosynthetic capacities and growth characteristics of *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. Physiol. Plant. ; 41: 116-123.
- NATO A. & Y. MATHIEU (1978): Changes in Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Ribulose-biphosphate carboxylase activities during the photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum* (cv Xanthi) cell suspensions. Plant Sci. Lett.; 13: 49-56.
- NATO A., Y. MATHIEU & J. BRANGEON (1981 a): Heterotrophic tobacco cell cultures during greening. II. Physiological and biochemical aspects. Physiol. Plant.; 53: 335-341.
- NATO A., J. BRANGEON & H. DULIEU (1981 b): Nuclear gene mutation effects on the plastid structure and RubPCase properties in *Nicotiana tabacum*. in: Photosynthesis V. Chloroplast development, G. Akoyunoglou Ed., Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa.
- NATO A. J. HOARAU & R. BOURDU (1982): The contribution of photosynthetic activity in the growth of *Nicotiana tabacum*. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. ; 253-254.
- NATO A., J. HOAREAU, R. BHATNAGAR & R. DULIEU (1984): Some characteristics of a Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase deficient green tobacco mutant in cell suspension cultures. in: Advances in Photosynthesis Research, vol. III: 799-802. Sybesma Ed.M. Nijhoff/W. Junk Publ. The Hague, Boston, Lancaster.

- NATO A. & J. VIDAL. (1983): Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in relation to physiological processes during the growth of cell suspensions cultures from *Nicotiana tabacum*. Physiol. Vég. ; 21(5): 1031-1039.
- NEF C. (1983): Accumulation & excretion d'alcaloïdes indoliques par des cellules de *Catharanthus roseus* cultivées en milieu non renouvelé privé d'auxines. Influence de la modulation du pH externe. Thèse de 3^e cycle. I.N.P. Toulouse.
- NESIUS K.K. & J.S. FLETCHER (1973): Carbon dioxide and pH requirements of non-photosynthetic tissue culture cells. Physiol. Plant. ; 28: 259-263.
- NESIUS K.K. & J.S. FLETCHER (1975): Contribution of non-autotrophic carbon dioxide fixation to protein synthesis in suspension cultures of Paul Scarlet's rose. Plant Physiol.; 55: 643-345.
- NISHIDA K. , F. SATO & Y. YAMADA (1980): Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. Plant Cell Physiol.; 21: 47-55.
- NITSCH J.P., NITSCH C. & S. HAMON (1968): Réalisation expérimentale de l'androgénèse chez divers *Nicotiana*. C.R. Séances Soc. Bio. Paris; 162: 369-372.
- NOBECOURT P. (1940): Nouvelles recherches sur les cultures des tissus végétaux. Bull. Soc. Bot. Fr.; 87: 117-120.
- OAKS A. (1974): The regulation of nitrate reductase in suspension cultures of soybean cells. Biochem. Biophys. Acta; 372: 122-126.
- OAKS A. & P. GADAL (1979): Nitrate utilisation in cells of higher plants . in: Cell compartmentation and metabolic channeling, G. Fisher Ed., Verlag Hem & Elsevier Holland Biomedical Press, Amsterdam; 245-254.
- OAKS A., I. STULEN, K; JONES, M.J. WINSPEAR, S. MISRA & I.L. BOESEL (1980): Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots . Planta ; 148 : 477-484
- OGREN W.L. & G. BOWES (1971): Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration. Nature; 230: 159-160.
- OGREN W.L., M.E. SALVUCCI & A.R. PORTIS Jr (1986): The regulation of Rubisco activity. Phil. Trans. R. Soc. Lond.; B 313: 337-346.
- OJI Y., Y. MIKI and OKAMOTO S. (1982): Extraction and affinity purification of NADH: nitrate reductase from barley (*Hordeum distichum* L.) roots. Plant Cell Physiol.; 23: 1025-1031.
- OJI Y., T. HAMANO, Y. RYOMA, Y. MIKI, N. WAKIUCHI & S. OKAMOTO (1985): Purification and characterization of NADH-nitrate reductase from leaves of 2-row barley, and its activity as affected by some metabolites. J. of Plant Physiol.; 119: 245-256.
- OJI Y., M. TAKAHASHI, Y. NAGAI and N. WAKIUCHI (1988): NADH-dependent nitrate reductase from two-row barley roots: Purification and comparison with leaf enzyme. Physiol. Plant.; 72: 311-315.
- OJIMA K. & K. OHIRA (1978): Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. in : Frontiers of plant tissue culture, IAPTC. Calgary University Press; 265-275.
- O' LEARY M.H. (1982) : Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. Ann. Rev. Plant Physiol.; 33: 297-315.

- O'LEARY M.H., J.E. RIFE, & J.D. SLATER (1981): Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. Biochemistry; 20: 7308-73014.
- O' NEAL D. & JOY K.W. (1973) -a- : Glutamine Synthetase in pea leaves. I: purification, stabilization and pH optima. Arch. Biochem. Biophys.; 159: 113-122.
- O' NEAL D. & JOY K.W. (1973) -b- : Localization of glutamine synthetase in chloroplasts. Nature New Biol.; 246: 61-62.
- OUCHTERLONY O. (1949): Antigen antibody reaction in gels. Acta Path. Microb. Scand.; 26: 507-515.
- OUCHTERLONY O. (1967): Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. in: Handbook of experimental immunology; 655-706. Weir Ed. Blackwell Sci. Public. Oxford.
- PANDEY K.N. & P.S. SABHARWAL (1982): γ -irradiation activates biochemical systems: Induction of nitrate reductase activity in plant callus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 79:5460-5464.
- PANEQUE A., F.F. DEL CAMPO, J.M. RAMIREZ and M.LOSADA (1965): Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim. Biophys. Acta; 109: 79-85.
- PAREILLEUX A. & N. CHAUBET (1980): Growth kinetics of apple plant cell cultures. Biotechnol. Letters; 2(6) : 291-296.
- PERRY L. (1980): Medicinal plants of East and Southeast Asia. Attributed properties and uses; 203-204. The M.I.T. Press Eds.; Cambridge, (Mass.) & London.
- PETERSON L.W. and R.C. HUFFAKER (1975): Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. Plant Physiol.; 55: 1009-1015.
- PETIARD V. (1981): Production de métabolites secondaires par la culture *in vitro* de cellules végétales. Le Sélectionneur français; 29: 67-76.
- PETIARD V. (1983): Conséquences méthodologiques de l'originalité de la cellule végétale cultivée *in vitro*. Application à la production de métabolites. Communication au Colloque: "Bioproduction et extraction de substances naturelles." Faculté de Pharmacie - Montpellier I - 23 Juin 1983.
- POOL E R.J. & E. BLUMWALD (1987) : Transport of organic ions in tonoplast vesicles. in: Plant Vacuoles. B. Marin Ed, NATO ASI Series, Plenum Press, New York & London. ; 219-225.
- PORTER & EDELMAN (1972): in : l'Immunologie; 38-40 .Fougereau M. "Que sais-je?" n°1358. Presses Universitaires de France .Paris. 127p.
- POULLE M. & S. RAMBOUR (1979): Mise en évidence de l'induction de la nitrate reductase dans une suspension cellulaire de *Silene alba*.. C.R.Acad. Sci. Paris, t.289, série D:1105-1108.
- POULLE M. & S. RAMBOUR (1985): Regulation of nitrate reductase in suspension culture of *Silene alba*. Immunochemical approach. Plant Science; 40: 111-115.
- PURANIK R.M. & H.S. SRIVASTAVA (1985): Increase in nitrate reductase activity in bean leaves by light involves a regulator protein. Agric. Biol. Chem.; 49(7): 2099-2104.
- RADIN D.N., BEHL H.M., PROKSCH P. & E. RODRIGUEZ (1982): Rubber and other hydrocarbons produced in tissue cultures of Guayule (*Parthenum argentatum*). Plant Sci. Lett.; 26: 301-310.

- RAJESEKHAR V.K. & R. OELMULLER (1987): Regulation of induction of nitrate reductase and nitrite reductase in higher plants. Physiol. Plant.; 71: 517-521.
- RAMBOUR S., J. VASSEUR & J. DUBOIS (1980): Federation of European Societies of Plant Physiology, Inaugural meeting, Edimburgh . Abstract, 220; 436.
- RAO L.V.M., N. DATTA, M. MAHADEVAN, S. GUHA-MUKERJHEE & S.K. SOPORY (1984): Influence of cytokinins and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. Phytochemistry; 23: 1875-1879.
- REBEILLE-BORGELLA F. (1983): Quelques observations sur le métabolisme du phosphate chez les cellules d'Erable sycomore. Thèse de Docteur ès Sciences Naturelles. Université Scientifique de Grenoble.
- REBEILLE F., R. BLIGNY & R. DOUCE (1982): Regulation of Pi uptake by *Acer pseudoplatanus* cells. Arch. Biochem. Biophys.; 219: 371-378.
- REDINBAUGH M.G. and CAMPBELL W.H. (1983): Purification of squash NADH:nitrate reductase by zinc chelate chromatography. Plant Physiol.; 71: 205
- REMMLER J.L. & W.H. CAMPBELL (1986): Regulation of corn leaf nitrate reductase: II. Synthesis and turnover of the enzyme activity and protein. Plant Physiol.; 80: 442-447.
- REUVENY Z. & P. FILNER (1976): A new assay for ATP sulfurylase based on differential solubility of th sodium salts adenosine 5' phosphosulfate and sulfate. Ann. Biochem. Exp. Med.; 75: 410.
- REYNOLDS E.S. (1963): The use of citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol.; 17: 208-212.
- RIAZ F., B. FARUQUI, A.H. KHAN & M.A. RAHMAN (1972): Differential solubilization of the proteins of *Abrus precatorius* Linn. Pakistan J. Sci. Ind. Res.; 15(1-2): 45-47.
- RIVAL A. (1983) : Sélection et culture en bioréacteur de suspensions cellulaires de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.) en vue de la production in vitro de sapogénines stéroïdiques . Etude cinétique de la croissance, de la nutrition et du métabolisme. D.E.A. de Sciences Agronomiques. Option Phytotechnie. ENSAM/USTL Montpellier. 88 pages.
- RIVAL A., BACCOU J.C., Y. SAUVAIRE & R. JONARD (1983) : Optimisation de la biosynthèse de sapogénines stéroïdiques par des suspensions cellulaires de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.) cultivées *in vitro* en fermenteur. Poster : PASTEUR BIOSCIENCES '83 . Colloque International sur les Biotechnologies. Institut Pasteur . Ministère de l'Industrie et de la Recherche. Paris; 6-9 Septembre 1983.
- RIVAL A., BACCOU J.C. & Y. SAUVAIRE (1984) : Stéroïdes médicinaux d'origine végétale : Une approche biotechnologique. Biofutur; 29 : 54-56.
- ROBIN P. (1979): Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de Maïs. Physiol. Vég.; 17(1); 45-54.
- ROBIN P., G. CONEJERO, L. PASSAMA & L. SALSAC (1983): Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. Physiol. Vég.; 21(1): 115-121.
- ROBIN P., L. SREIT, W.H. CAMPBELL & J.E. HARPER (1985): Immunochemical characterization of nitrate reductase forms from Wild-type (cv Williams) and nr₁ mutant soybean. Plant Physiol.; 77: 232-236.

- ROSE D. & S.M. MARTIN (1974) :Parameters for growth measurement in suspension cultures of plant cells . Can. J. Bot.; 52 : 903.
- ROSE D. & S.M. MARTIN (1975) : Effect of ammonium on on growth of plant cells (*Ipomea* sp) in suspension cultures. Can. J. Bot.; 53: 1942-1949.
- SAHAI O.P. & M.L. SHULER (1983): Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabaccum*. Biotechnol. Bioeng.; XXVI: 111-120.
- SAHULKA J. & L. LISA (1978) : The influence of exogenously supplied sucrose on glutamine synthetase and glutamate déshydrogenase levels in excised *Pisum sativum* roots. Biol. Plant.; 20; 446-452.
- SALSAC L., S. CHAILLOU, J.F. MOROT-GAUDRY, C. LESAIN & E. JOLIVET (1987): Nitrate and ammonium nutrition in plants. Plant Physiol. Biochem.; 25(6): 805-812.
- SARROBERT B., P. BRUNET & N. PARIS-PIREYRE (1989) : Mise au point d'une méthode par chromatographie liquide haute performance échangeuse d'ions en détection ultra violette, pour le dosage des cations dans les sèves xylémiques. J. of Chrom.; 462; 303-313.
- SASSE F. K.H. KNOBLOCH & J. BERLIN (1982): Induction of secondary metabolism in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabaccum* and *Pelargonium harmala*. in : Plant Tissue Culture 1982, A. Fujiwara Ed., IAPTC Tokyo : 343.
- SASSON A. (1986) : Quelles biotechnologies pour les pays en développement.. Biofutur /Unesco Ed. Paris, 200 pages.
- SATO F., K. NISHIDA & Y. YAMADA (1980): Activities of carboxylation enzymes and products of $^{14}\text{CO}_2$ fixation in photoautotrophically cultured cells. Plant Sci. Lett.; 20: 193-200.
- SATO F., N. NAGAKAWA, T. TANIO & Y. YAMADA (1981): An improved medium for the photoautotrophic culture of *Cytisus scoparius* link cells. Agric. Biol. Chem.; 45: 2463-2467.
- SATO F. & Y.YAMADA (1984): High berberine producing cultures of *Coptis japonica* cells. Phytochemistry; 23(2): 281-285.
- SATO F., S. TAKEDA & Y. YAMADA (1987) : A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic, and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. Plant Cell Reports ; 6: 401-404.
- SAUNDERS J.A & W. Mc CLURE (1975): Phytochrome controlled phenylalanine ammonia lyase in *Hordeum vulgare* plastids. Phytochemistry; 141 : 1285-1289.
- SAUVESTY A., GENDRON G. & F.P. CHALIFOUR (1986): Améliorations de la technique d'extraction de la nitrate réductase et de mesure *in vitro* de son activité dans les feuilles d'Avoine. Physiol. Vég.; 24(3) : 377-381.
- SAUX C., J. GABARD & J.F. MOROT-GAUDRY (1986) : Modifications métaboliques liées à la perte de l'activité nitrate réductase chez un mutant de *Nicotiana plumbaginifolia*. C.R. Acad. Sci. Paris; 302 : 391-394.

- SAWHNEY S.K., M.S. NAIK & D.J.D. NICHOLAS (1978): Regulation of NADH supply for nitrate reduction in green plants via photosynthesis and mitochondrial respiration. Biochem. Biophys. Res. Comm.; 81(4): 1209-1216.
- SCHEID H.W., EHMKE A., & T. HARTMANN (1980): Plant DNA-dependent glutamate dehydrogenase. Purification, molecular properties and metal ion activation of the enzymes from *Lemna minor* and *Pisum sativum*. Z. Naturforsch., 35c, 213-221.
- SCHERER H.W, S. SCHUBERT & K. MENGEL (1982) : The effect of potassium nutrition on growth rate, carbohydrates content, and water retention in young wheat plants. Z. Pflanzenernähr. Bodenk.; 145: 237-245.
- SCHMERDER B. & H. BORRIS (1986) : Induction of nitrate reductase by cytokinins and ethylene in *Agrostemma githago* L. embryos. Planta : 169 : 589-593.
- SCHMIDT S., H. DRUMM-HERREL, R. OELMULLER & H. MOHR (1987) : Time course of competence in phytochrome-controlled appearance of nuclear-encoded plastidic proteins and messenger RNAs. Planta; 170; 400-407.
- SCHRADER L.E., G.L. RITENOUR, G.L. EILRICH & R.G. HAGEMAN (1968) : Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. Plant Physiol. : 43; 930-940.
- SCHRADER L.E., D.A. CATALDO & M. PETERSON (1974): Use of protein in extraction and solubilization of nitrate reductase. Plant Physiol.; 53: 688-690.
- SCOPES R. K. (1987): Maintenance of active enzymes in : Protein purification : Principles and Practice. Coll.: Springer Advanced Texts in Chemistry. Springer Verlag Ed., New York; 236-252.
- SECOND G. & P. TROUSLOT (1980): Electrophorèse d'enzymes de riz. Travaux & Documents de l'ORSTOM; 120: 88 pages. Paris.
- SEENI S. & A. GNANAM (1982): Carbon assimilation in photoheterotrophic cells of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in still nutrient-medium. Physiol. Plant.; 70: 823-826.
- SEDMAN J.J. & S.E. GROSSBERG (1977): A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. Anal. Biochem.; 79: 544-552.
- SEYER P., D. MARTY, A.M. LESCURE & C. PEAUD-LENOEL (1975) : Effect of cytokinin on chloroplast cyclic differentiation in cultured tobacco cells. Cell Differ.; 4 : 187-197.
- SHAH C.S. & J. G. BHATT (1973): *Abrus precatorius* as a substitute for Liquorice. Indian J. Pharm.; 35(3): 102-104.
- SHAPIRO B.M. & E.R. STADTMAN (1970): The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol.; 24 : 501-524.
- SHOKUT T.A., C.P. WOLK, J. THOMAS, J.C. MEEKS, P.W. SHAFFER & W.S. CHIEN (1978): Initial organic products of assimilation of ^{13}N ammonium and ^{13}N nitrate by tobacco cells cultured on different sources of nitrogen. Plant Physiol. : 62: 299-304.
- SIDDIQUI S., B.S. SIDDIQUI & Z. NAIM (1978): Studies on the steroidal constituents of *Abrus precatorius* Linn. (Scarlet variety). Pakistan J. Sci. Ind. Res. ; 21(5-6): 158-161.
- SMARELLI & CAMPBELL (1981) : Immunological approach to structural comparisons of assimilatory nitrate reductases. Plant Physiol. 68; 1226-1230.

- SNAPP S., D.A. SOMERS, R.L. WARNER & A. KLEINHOF (1984): Immunological comparisons of higher plant Nitrate Reductase. Plant Sci. Lett.; 36: 13-18.
- SNELL F.D. & C.T. SNELL (1949): Colorimetric methods of analysis. Van Nostrand Ed. New York. Vol.2: 804.
- SOLOMONSON L.P. (1975): Purification of NADH: nitrate reductase by affinity chromatography. Plant Physiol.; 68: 1226-1230.
- SOLORZANO L. (1969): Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. Limnol. Ocean.; 14: 799-801.
- SOMERS D.A., T.M. KUO, A. KLEINHOF, & R.L. WARNER & A. OAKS (1983 a): Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. Plant Physiol.; 72: 949-952.
- SOMERS D.A., T.M. KUO, A. KLEINHOF & R.L. WARNER (1983 b): Nitrate reductase-deficient mutants in barley. Immunoelectrophoretic characterization. Plant Physiol.; 71: 145-149.
- SPURR A.R. (1969): A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruc. Res.; 26: 31-43.
- STABA E.J. (1980): Plant Tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press Ed., Boca Raton, Florida.
- STADTMAN E.R. (1973): A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism in: The enzymes of glutamine metabolism. S Prusiner & E.R. Stadtman Eds, Academic Press, New York, London.: 1-6.
- STECK P. & V. PETIARD (1985): Applications industrielles des cultures végétales: La production de métabolites in: Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale. Actes du: 10^e Colloque de la section de Microbiologie Industrielle & Biotechnologie de la S.F.M.; 275:303.
- STREET H.E. (1966): The nutrition and metabolism of plant tissue and organ culture. in: Cell and tissue culture. E.D. Willner Ed., Academic Press, London: 533-629.
- SUZUKI A., P. GADAL & A. OAKS (1981) : Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. Planta; 151: 457-461.
- SUZUKI A. & P. GADAL (1982): Glutamate synthase from rice leaves. Plant Physiol.; 69: 848-852.
- SUZUKI A. (1987): Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase: I. Structural, immunochemical and catalytic properties. Biochimie; 69: 723-734.
- TABATA (1978): Selection of cell lines with higher yield of secondary products. in: Frontiers of plant tissue culture. IAPTC. Calgary, Thorpe Ed., Calgary Univ. Press: 213-222.
- TAL B., J GRESSEZ & I. GOLDBERG (1982): The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells grown in batch cultures. Planta Medica; 44: 111-115.
- TAUSSKY H. & E. SHOOR (1953): A micro colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem.; 202: 675-685.

- THOM M., A. MARETZKI, E. KOMOR & W.S. SAKAI (1981): Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tiss. Org. Cult.; 1: 3-14.
- TIMMERS T. (1989) : Distribution of calcium and calmodulin in different developmental stages during carrot somatic embryogenesis. Communication : X^e Colloque de la Section Française de l'IAPTC. Versailles (France) .Octobre 1989.
- TING I.P. & C.B OSMOND (1973): Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. Plant Physiol.; 51: 448-453.
- TISCHNER R. & A. SCHMIDT (1984): An L-cysteine dependant nitrate reductase inactivating factor in synchronous *Chlorella sorokiniana*. J. Plant Physiol.; 117: 191-200.
- TORREY J., J. REINERT & N. MERKEL (1962): Mitosis in suspension culture of higher plant cells in synthetic medium. Amer. J. Bot.; 49: 420-425.
- TULECKE & NICKELL (1959) : Production of large amounts of plant tissue by submerged cultures. Science; 130 : 863-864.
- UEDAN K. & T. SUGIYAMA (1976) : Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. Plant Physiol.; 507: 906-910.
- UEDAN K. & T. SUGIYAMA (1977): Correction. Plant Physiol.; 59: 523.
- VANDERHOVEN C. & J.P. ZRYD (1978): Changes in malate content and in enzymes involved in dark fixation during growth of *Acer pseudoplatanus* cells in suspension culture. Physiol. Plant.; 43: 99-103.
- VASIL & HILDEBRANDT (1966) : Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown *in vitro*. Planta; 68: 69-82.
- VAUGHN K.C. & S.O. DUKE (1981): Histochemical localization of nitrate reductase. Histochemistry; 72: 191-198.
- VAUGHN K.C., S.O. DUKE, E.A. FUNKHAUSER (1984): Immunochemical characterization and localization of nitrate reductase in norflurazon treated soybean cotyledons. Physiol. Plant.; 62: 481-484.
- VELIKY (1971) : Synthesis of carboline alkaloids by plant cell culture. Phytochemistry; 11: 1405-1406.
- VELIKY I.A. & S.M. MARTIN (1970) : A fermentor for plant cell suspension culture. Can. J. Microbiol.; 16 : 223-226.
- VELIKY I.A. & D. ROSE (1973): Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. Can. J. Bot.; 51: 1837-1844.
- VENKETESWARAN S. (1965): Studies on the isolation of green pigmented callus tissue of tobacco and its continued maintenance in suspension cultures. Physiol. Plant.; 18: 776-789.
- VERMA D.P.S. & R.B. VAN HUYSTEE (1971) : Derivation, characteristics, and large scale cultivation of a cell line from *Arachis hypogea* L. cotyledons. Exp. Cell. Res.; 69: 402.
- VORA S. (1985): Monoclonal antibodies in enzyme research : Present and potential applications. Anal. Biochem. ; 144:307-318.

- WALLACE W. (1973) : A re-evaluation of the nitrate reductase content in maize roots. Plant Physiol.; 55: 774-777.
- WALLSGROVE R.M., P.J. LEA & B.J. MIFLIN (1979): Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. Plant Physiol.; 63: 232-236.
- WARNER R.L. & A. KLEINHOF (1974): Relations between Nitrate Reductase, Nitrite Reductase, and Ribulose Diphosphate Carboxylase activities in chlorophyll-deficient mutants of barley. Crop Sci.; 14: 654-658.
- WATERMAN P.G. (1986) : A phytochemist in the african rain forest . Phytochemistry; 25 : 3-17.
- WATT J.M & M.G. BREYER-BRANDWIJK (1962): The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. E. & S. Livingstone Eds. Edinburgh & London.
- WATT M.P., V.M. GRAY & C.F. CRESSWELL (1986) : The effect of oxygen on nitrate and nitrite assimilation in leaves of *Zea mays* L. under dark conditions. Planta ; 169: 339-344.
- WEBER K. & M. OSBORN (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem.; 244(16): 4406-4412.
- WEEKE B. (1973): Rocket immunoelectrophoresis. in : Quantitative immunoelectrophoresis. Axelsen , Kroll & Weeke Eds. Scand. J. Immunol.; 2(1): 37-46.
- WEI CHI SUAN (1973): Two phytotoxic anti-tumor proteins: Ricin and Abrin. J. Biol. Chem.; 248(10): 3745-3747.
- WEISSMAN G.S. (1972 a): Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower . Plant Physiol. : 49; 138-141.
- WEISSMAN G.S. (1972 b) : Influence of ammonium and nitrate nutrition on thre pyridine and adenine nucleotide in soybean and sunflower . Plant Physiol. : 49: 142-145.
- WEISMANN G.S. (1976) : Glutamine synthetase regulation by energy charge in sunflower roots. Plant Physiol.; 57: 339-343.
- WHITE P.R. (1939) : Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. Am. J. Bot.; 26: 44-59.
- WIERNAN R. (1981): Secondary plant products and cell & tissue differentiation. in: The Biochemistry of Plants; 7: 85-116. Conn E.E. Edit. Academic Press. New York, London.
- WILLIAMS L.E. & R.A. KENNEDY (1978): Photosynthetic carbon metabolism during leaf ontogeny in *Zea mays* L.: Enzyme studies.: Planta; 142:269-274.
- WINK M. & HARTMANN T. (1980): Production of quinozilidine alkaloids by photomixotrophic cell suspension cultures: Biochemical and biogenetic aspects. Planta Med. ; 40: 149-155.
- WOLTER K.E.(1975) : Peroxydases as indicators of growth and differentiation in aspen callus cultures. Physiol. Plant.; 33 : 219-233.
- WRAI J.L. & R. BRICE (1973): Location and density labelling of acid invertase in aging discs of *Daucus carotta* storage tissue. Phytochemistry ; 12: 1917-1921.
- WRAY J.L. & P.FILNER (1970) : Structural and functional relationships of enzymes activities induced by nitrate in barley. Biochem. J.; 119 : 715-725.

- WRAY & KIRK (1981) : Inhibition of NADH-nitrate reductase degradation in barley extracts by leupeptin. Plant Sci. Lett. : 23 : 207-213.
- WU C.Y. & S.C. CHEN (1974): Tranquilizing effect of N-Monomethyl Tryptamine prepared from *Abrus precatorius* on the trigeminal nervous system in cat. Bull. Inst. Zool., Academia Sinica; 13(1): 1-13.
- WYLLEGALA C., R. MEYER & K.G. WAGNER (1985) : Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia*. II Correlation with nutrient uptake and macromolecular synthesis. Planta, 166 : 446-451.
- YAMADA Y. & F. SATO (1978): The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. Plant & Cell Physiol.; 19: 691-699.
- YAMADA Y., F. SATO & K. WATANABE (1982): Photosynthetic carbon metabolism in cultured photoautotrophic cells. in: Plant Tissue Culture 1982, Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, IAPTC, Tokyo: 249-250.
- YAMASHITA T. (1986): Changes in ribulose 1,5-biphosphate carboxylase concentration due to nitrogen supply in Mulberry leaves (*Morus alba* L.). Annals of Botany; 58: 277-280
- YAMAYA T. and K. OHIRA (1977): Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. Plant & Cell Physiol.; 18: 915-925.
- YASUDA T., T. HASHIMOTO, F.SATO & Y.YAMADA (1980) : An efficient method of selecting photoautotrophic cells from cultured heterogenous cells. Plant & Cell Physiol.; 21 : 929-932.
- YOUNG M. (1973): Studies on the growth in culture of plant cells . XVI. Nitrogen assimilation during nitrogen-limited growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in chemostat culture . J. of Exp. Bot.; 24(83): 1172-1185.
- ZENK M.H., H. EL-SHAGI & U. SCHULTE (1975): Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Med. (supplement): 79-101.
- ZENK M.H. (1978): The impact of plant cell culture on industry. in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, T. A. Thorpe Ed., Univ. of Calgary Press, Calgary, Alberta, Canada.: 1-14.
- ZENK M.H. & B. DEUS (1982): Natural products synthesis by plant cell cultures. in: Plant Tissue Culture 1982, Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, IAPTC, Tokyo : 391.
- ZINK M.W. & I.A. VELIKY (1979): Acid phosphatases of *Ipomea* sp. cultured *in vitro*. 1. Influence of pH and inorganic phosphate on the formation of phosphatases. Can J. of Bot.; 57(7): 739-753.

ANNEXES

ANNEXE A

COMPOSITION DES SOLUTIONS TAMPON

1) Tampon d'extraction des carboxylases: RubPC & PEPC:

Tris-HCl 100 mM. pH=7,6

- DTT:	1mM
- EDTA	1mM
- MgCl ₂	1mM
- β-Mercaptoéthanol	10 mM
- PMSF*	250 μM
- PVP (facultatif)	1g.100 g ⁻¹ M.F.

* solution propanolique à préparer extemporanément

2) Tampon d'extraction pour purification de la PEPC à partir de plantules de maïs:

Tris-HCl 100 mM. pH=8,0

- MgCl ₂	10 mM
- Glycérol	5% (w/v)
- PVP	1g.100 g ⁻¹ M.F.
- β-Mercaptoéthanol	100 mM

3) Tampon d'extraction de la Nitrate réductase:

Tris-HCl 100 mM. pH=7,6

- EDTA	1mM
- FAD	10 μM
- DTT	1mM
- PMSF*	250 μM

* solution propanolique à préparer extemporanément

4) Tampon d'extraction de la Glutamine Synthétase:

Tris-HCl 50 mM. pH=7,6

- DTT	1 mM
- EDTA	4 mM
- PMSF*	250 μ M

* solution propanolique à préparer extemporanément

5) Tampon d'électrophorèse: Immunorockrets (gels + tampon de migration)

Tris-Glycine pH=8,3

- Tris	6g/200ml
- Glycine	29g/200ml

Solution gélosée pour la préparation des plaques: pour une plaque de 17x8 cm:
300 mg d'agarose (*Sigma A6013 ou IBF A37*) pour 36 ml de tampon
Tris-Glycine pH=8,3.

6) Tampon d'immunodiffusion: OUCHTERLONY & MANCINI:

Solution stock de tampon Borate (concentrée 10x) pH=8,1

- Borate NaOH (1,66M)	10,5 g
- NaCl (1,30M)	7,6 g
- H ₂ O qsp 100ml.	

Solution gélosée pour la préparation des lames:

- Agarose (<i>Sigma A6013 ou IBF A37</i>)	1,5 g
-Solution Tampon Borate (diluée 10x)	10ml
- Glycérol	5ml
Répartir dans des tubes à essai en fractions de 3 ml après dissolution de l'agarose, conserver à 0-4°C.	

7) Tampon d'électrotransfert:

Tampon Tris-Glycine pH=8,3

- Tris	12 g
- glycine	72 g
- méthanol	1 litre
- H ₂ O	qsp: 5 litres

ANNEXE B

COMPOSITION DES MILIEUX ET REACTIFS

1) Dosage d'activité Glutamine Synthetase:

* Mélange A:

- MgSO ₄	20 mM
- Glutamate	80 mM
- Hydroxylamine (NH ₂ OH)	6 mM
- EDTA	4 mM

Ajuster à pH=7,6 avec NaOH

* Mélange B:

- FeCl ₃	0,37M
- TCA	0,20M
- HCl	0,67N

2) Dosage des protéines solubles: (Méthode de SEDMAK & GOLDBERG)

Solution de Sedmak:

Bleu de Coomassie G250 : 0,06% dans PCA 3%

3) Révélation de l'activité peroxydasique: (Immunoblotting)

Tris-HCl 100 mM	85 ml
4-Chloronaphtol (solution*)	17 ml
H ₂ O ₂ 30%	34 µl

* Dissoudre 3 mg de 4-Chloronaphtol dans 1 ml d'éthanol, puis ramener à 17 ml avec H₂O.

4) Mélange dénaturant : (SDS PAGE)

Tampon Tris-HCl 1M pH=6,8	400 µl
SDS 10%	800 µl
β-Mercaptoéthanol	400 µl
Saccharose	1 g
Urée	300 µg
BBP	qqg mg pour coloration

5) Solution de coloration des protéines: (*Electrophorèse, Immunodiffusion*)

Bleu de Coomassie G250	25 g
Acide acétique glacial	100 ml
Méthanol	400 ml
H ₂ O	qsp 1 litre

6) Solution de décoloration: (*Electrophorèse, Immunodiffusion*)

Acide acétique glacial	100 ml
Méthanol	400 ml
H ₂ O	qsp 1 litre

7) Mélange scintillant: (*Dosages radiochimiques .Activité des carboxylases*)

P.P.O. 0,5% dans un mélange Toluène/Triton (2/1; v:v)

ANNEXE C

PROTOCOLES DE DOSAGES MINERAUX

A) DOSAGE COLORIMETRIQUE DES NITRATES (Méthode à la sulfanilamide)

1) REACTIFS :

- Sulfanilamide : 2.5 g.
- Acide Phosphorique : 25 g.
- Dichlorhydrate N1 Naphtylethylene diamine (D.N.D.) : 0.125 g.

2) PREPARATION :

- Réactif :

Mélanger l'acide phosphorique avec environ 125 ml H₂O ; ajouter la sulfanilamide et le DND. Agiter jusqu'à dissolution et compléter à 250 ml. Stocker dans une bouteille colorée à l'abri de la lumière. Cette solution est stable plusieurs mois.

- Solution de NaOH : 0,6 N (24 g.l⁻¹.)- Solutions de CuSO₄, 5H₂O :

* solution Stock : 0.3909 g. dans 100 ml H₂O

* pour le dosage : diluer 3.2 ml de solution Stock dans 100 ml H₂O.

- Solutions de Sulfate d'Hydrazine :

* solution Stock : 2.7 g. dans 100 ml H₂O.

* pour le dosage : diluer 5 ml de solution Stock dans 100 ml H₂O.

- Solution étalon de Nitrates :

* solution Stock : 1.629 g. de KN₃ dans 100 ml H₂O. (Solution à 10 g.l⁻¹ de N₃).

* Pour le dosage : diluer 100 fois pour une solution à 100 mg.l⁻¹.

* gamme-étalon de 0 à 100 mg.l⁻¹. (0 à 5 µg de NO₃ dans le tube).

3) PROTOCOLE :

- Mélanger dans l'ordre :

- * 0.210 ml de solution de CuSO_4 .
- * 0.050 ml d'échantillon (milieu M.&S. dilué au 1/50°).
- * 0.160 ml de sulfate d'hydrazine.
- * 0.210 ml de solution NaOH.
- * 0.420 ml de réactif.

- Agiter.

- Chauffer à 37°C durant 15 mn (facultatif) ; rehomogénéiser.

- Mesurer la D.O. au spectrophotomètre à 535 nm (D.O. < 0.7 pour 100 mg.l⁻¹).

B) DOSAGE COLORIMETRIQUE DE L'AMMONIUM (Méthode au phénol hypochlorite)

1) REACTIFS :

- Phénol : 10 g.
- Ethanol 95° : 100 ml.
- NaOH : 5 g.
- Nitroprussiate de Sodium : 1 g. (1.137 g. pour la forme 2 H₂O).
- Citrate de Sodium : 100 g. (114 g. pour la forme 2 H₂O).
- Hypochlorite de Sodium : Solution du commerce à 8°Cl.

2) PREPARATION :

- Solution alcoolique de Phénol : Dissoudre 10 g. de Phénol dans 100 ml d'Ethanol 95°.
- Solution de Nitroprussiate : Dissoudre 1 g. de Nitroprussiate de Sodium dans 200 ml d'eau bidistillée. Cette solution, conservée en flacon teinté, est stable un mois.
- Solution de Citrate de Sodium : Dissoudre 100 g. de Citrate de Sodium et 5 g. de NaOH dans 500 ml d'eau bidistillée.
- Solution oxydante : Ajouter à 10 ml de solution de Citrate, 5 ml de solution d'Hypochlorite de Sodium. Cette solution doit être renouvelée chaque jour.
- Solution étalon d'Ammonium :
 - * solution Stock à 200 mg.l⁻¹ de NH₄⁺ : 59.4 mg de chlorure d'Ammonium (NH₄Cl) dans 100 ml d'H₂O.
 - * pour le dosage : Diluer 100 fois pour obtenir une solution étalon à 2 mg.l⁻¹ de NH₄⁺.
 - * gamme étalon : de 0 à 1.6 mg.l⁻¹ (0 à 4 µg. de NH₄⁺ dans le tube).

3) PROTOCOLE :

- Mélanger dans l'ordre :
 - * 2.500 ml. de solution à doser : (milieu de M.&S. dilué au 1/100° - soit 25 µl de milieu non dilué + 2500 µl H₂O bidistillée).
 - * 0.100 ml de solution alcoolique de phénol.
 - * 0.100 ml de solution de nitroprussiate de sodium.
 - * 0.250 ml de solution oxydante.
- Agiter soigneusement.
- Laisser reposer à température ambiante au minimum 1 heure. (maxima 24 heures). La coloration obtenue est bleue, le témoin est jaune.
- Mesurer la D.O. au spectrophotomètre à 640 nm.

C) DOSAGE COLORIMETRIQUE DU PHOSPHORE INORGANIQUE
(Méthode au sulfomolybdate)

1) REACTIFS :

- Acide Sulfurique : H_2SO_4 20N. (278 ml de H_2SO_4 36N - ou 66°B - dans 222 ml d'eau).
- Molybdate d'Ammonium : 25 g.
- Sulfate de Fer : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2.5 g.

2) PREPARATION :

- Réactif sulfomolybdique : Dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium dans 250 ml de H_2SO_4 (20N). Ce réactif, dans une bouteille inactinique en verre, se conserve plusieurs mois au réfrigérateur.
- Milieu de dosage : Dissoudre sur agitateur 2.5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans environ 35 ml d'eau bidistillée. Ajouter 5 ml de réactif sulfomolybdique, puis ajuster à 50 ml. Ce milieu est à préparer le jour même.
- Solution étalon de Phosphore :
 - * pour le dosage : 218.7 mg de KH_2PO_4 anhydre dans 250 ml H_2O . (200 mg.l^{-1} de Pi).
 - * gamme étalon de 0 à 80 mg.l^{-1} de Pi. (0 à 20 μg de Pi dans le tube).

3) PROTOCOLE :

- Mélanger, dans l'ordre :
 - * 0.250 ml d'échantillon (milieu M.&S. non dilué).
 - * 0.500 ml de milieu de dosage.
 - * 1.250 ml d'eau bidistillée.
- Agiter.
- Laisser reposer 15 mn à température ambiante.
- Mesurer la D.O. au spectrophotomètre à 690 nm.

D) DOSAGE NEPHELOMETRIQUE DES SULFATES (Méthode au chlorure de baryum)

1) REACTIFS :

- HCl concentré (37%) : 10 ml.
- Tween 20 ou Polyvinylpyrrolidone soluble : 25 g.
- Chlorure de Baryum anhydre : 10 g. (ou 11.728 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

2) PREPARATION :

- Solution de HCl : diluer 10 ml d'HCl (37%) dans 100 ml d' H_2O .
- Solution de Tween 20 ou de PVP à 25% : dissoudre 25 g dans 100 ml d' H_2O .
- Solution de Chlorure de Baryum stabilisée : dissoudre 10 g de BaCl_2 anhydre (11.728 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) avec 20 ml de solution de Tween 20 (ou 5 ml de solution de PVP) dans 100 ml H_2O .
- Solution étalon de Sulfates :
 - * solution étalon à $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de SO_4 : 148 mg de Sulfate de Sodium anhydre (ou 257 mg de Sulfate de Magnesium, $7 \text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml H_2O .
 - * gamme étalon de 0 à $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. (0 à 200 μg dans le tube).

3) PROTOCOLE :

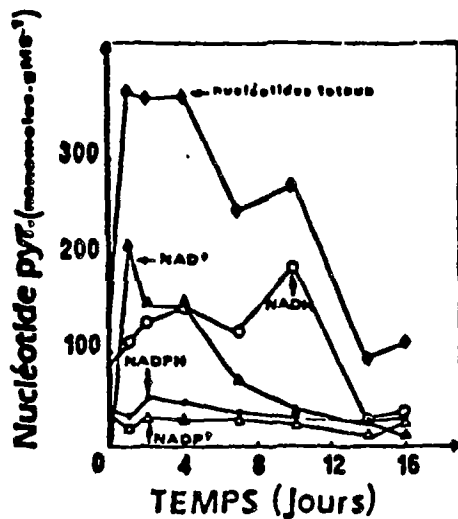
- Mélanger dans l'ordre :
 - * 1.000 ml d'échantillon (milieu M.&S. non dilué).
 - * 0.025 ml d'HCl 1/10°.
 - * 0.250 ml de solution de BaCl_2 stabilisée.
- Agiter très énergiquement (plusieurs renversements de tube).
- Laisser reposer 15 mn à température ambiante.
- Agiter vigoureusement à nouveau.
- Mesurer la D.O. au spectrophotomètre à 650 nm.

Annexe D

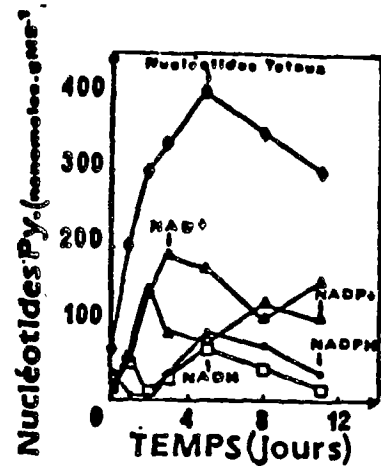
**Evolution des nucléotides adényliques et pyrimidiques
dans les suspensions cellulaires d'*Abrus precatorius*
photomixotrophes ou hétérotrophes
cultivées en fioles ou en bioréacteur.**

(HARDY-CLARIS, 1988)

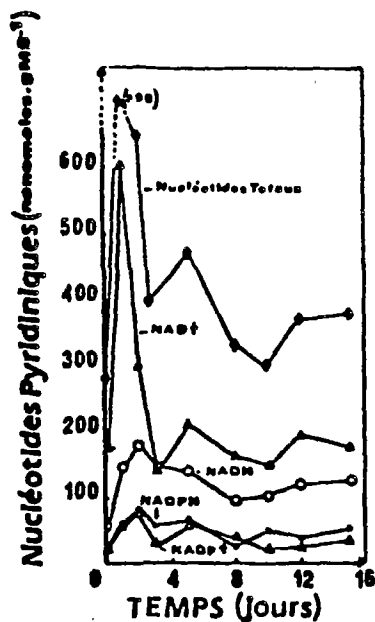
Evolution des différents nucléotides pyridiniques au cours d'un cycle de culture de suspensions cellulaires d'*Abrus* (HARDY-CLARIS, 1988)



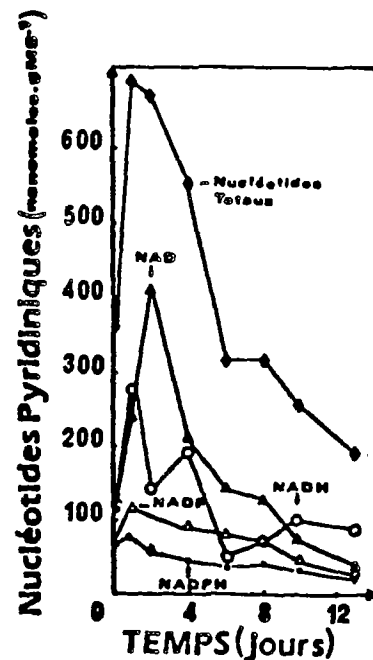
Evolutions des différents nucléotides pyridiniques NAD⁺ (Δ) ; NADH (○) ; NADPH (◻) ; NADP⁺ (Δ) au cours d'un cycle de culture de la suspension photomixotrophe d'*Abrus* cultivée en erlenmeyer.



Evolutions des différents nucléotides pyridiniques NAD⁺ (Δ) ; NADH (○) ; NADP (Δ) et NADPH (◻) au cours d'un cycle de culture de la suspension photomixotrophe d'*Abrus* en réacteu

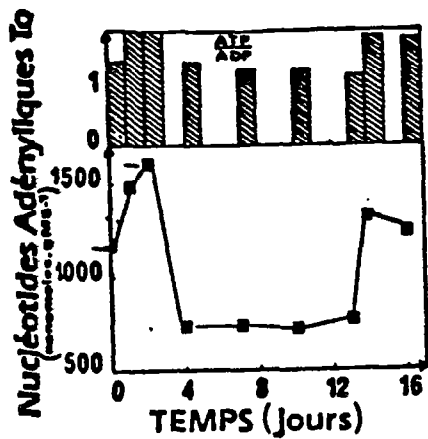


Evolutions comparées des différents nucléotides pyridiniques : NAD⁺ (Δ) ; NADH (○) ; NADP⁺ (Δ) et NADPH (◻) au cours d'un cycle de culture de la suspension hétérotrophe d'*Abrus* cultivée en erlenmeyer.

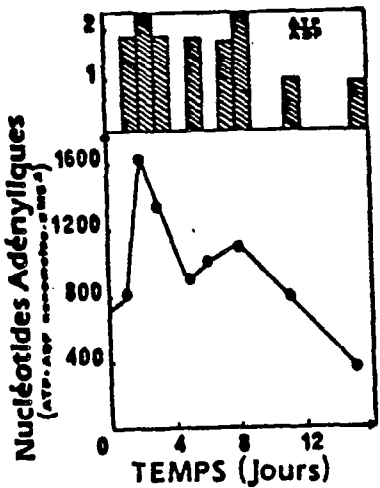


Evolutions comparées des différents nucléotides pyridiniques : NAD⁺ (Δ) ; NADH (○) ; NADPH (◻) ; NADP⁺ (Δ) au cours d'un cycle de culture de la suspension hétérotrophe d'*Abrus* cultivée en réacteur.

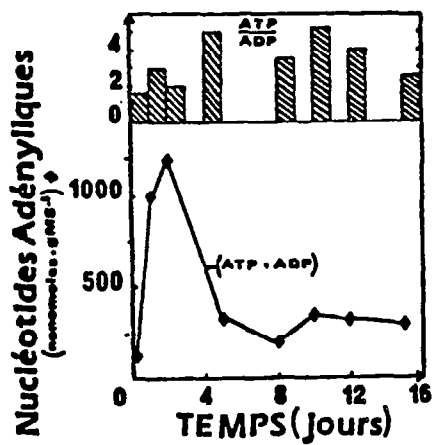
Evolution des nucléotides adényliques et du rapport ATP/ADP au cours d'un cycle de culture de suspensions cellulaires d'Abrus (HARDY-CLARIS, 1988)



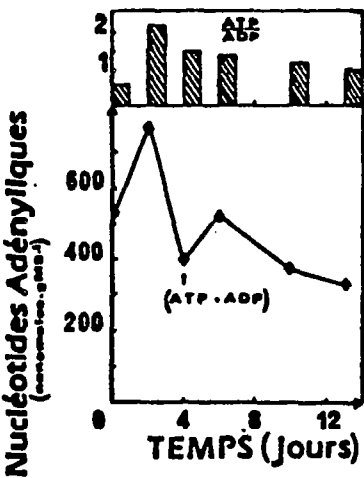
Evolution des nucléotides adényliques (■) et du rapport ATP/ADP (▨) au cours d'un cycle de culture de la suspension photomixotrophe d'*Abrus* cultivée en erlenmeyer.



Evolution des nucléotides adényliques (●) et du rapport ATP/ADP (▨) au cours d'un cycle de culture de la suspension photomixotrophe d'*Abrus* en réacteur.



Evolution des nucléotides adényliques (◆) et du rapport ATP/ADP (▨) au cours d'un cycle de culture de la suspension hétérotrophe d'*Abrus* cultivée en erlenmeyer.



Evolution des nucléotides adényliques (◆) et du rapport ATP/ADP (▨) au cours d'un cycle de culture de la suspension hétérotrophe d'*Abrus* cultivée en réacteur.

ADDENDUM

A PROPOS DE LA PRESENCE DE GLYCYRRHIZINE

ET AUTRES DERIVES TRITERPENIQUES

CHEZ ABRUS PRECATORIUS

(PLANTE ENTIERE ET MATERIEL CULTIVE IN VITRO)

par
Pierre TROUSLOT, Claudine NEF et Hervé CHRESTIN, Laboratoire de Physiologie
Biotechnologie Végétale Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

INTRODUCTION

La bibliographie indique que les feuilles d'*Abrus precatorius* renferment des saponines triterpéniques, dont une largement majoritaire: la glycyrrhizine, représentant de 5 à 10 % du poids sec des feuilles (1,2,3,4), et quelques autres dérivés ou aglycones triterpéniques mineurs (5). Il était intéressant de comparer l'évolution de cet hétéroside triterpénique majeur au cours des différents stades physiologiques de matériel issu d'*Abrus* cultivé *in vitro*, comparativement dans les cals hétérotrophes, photomixotrophes, les suspensions cellulaires hétérotrophes, photomixotrophes et phototrophes.

MATERIEL ET METHODES

Matériel Végétal

Les feuilles d'*Abrus precatorius* sont prélevées sur les pieds cultivés au jardin des plantes médicinales du Centre d'Adiopodoumé, pieds témoins dont sont issues les cultures *in vitro*. Les feuilles sont soit séchées 5 mn au four à micro-ondes, soit lyophilisées.

Les cals et les cellules d'*Abrus precatorius* proviennent du souchier du Laboratoire. Les cellules ou les cals sont soit séchées 15 mn au four à micro-ondes, soit lyophilisées.

Méthodes

Nous avons essayé de mettre au point une méthode d'extraction de la glycyrrhizine des feuilles d'*Abrus precatorius* en adaptant le protocole utilisé par les auteurs pour l'extraction de la glycyrrhizine des racines de *Glycyrrhiza glabra*. (6,7,8).

1 g de feuilles d'*Abrus precatorius* séchées sont mises dans 70 ml de MeOH puis broyées au Turrax deux fois de suite pendant 30 sec.

Faire bouillir à reflux pendant 30 mn, puis filtrer sur verre Fritté n° 5.

Rincer 3 fois les débris cellulaires avec MeOH chaud: Le filtrat, environ 240 ml, est évaporé sous vide à 35°C jusqu'à un volume de 50 ml. Ajouter 4 volumes d'éther diéthylique. Mettre 30 mn à 4°C. Un précipité floconneux se forme. Centrifuger 30.000 g/3 mn.

Le culot blanc, séché à l'air (sèche-cheveux à froid) devient brun et possède effectivement un "goût de réglisse". Le poids du culot représente environ 8 % du poids sec.

Le culot sec est repris dans un volume connu d'éluant pour HPLC puis centrifugé à 30.000 g/3mn.

Le culot jaunâtre, obtenu après cette deuxième centrifugation, a perdu son "goût de réglisse".

Le surnageant brun et limpide est analysé en HPLC (6,7,9) dans le système MeOH/H₂O/Acide Acétique. (60/34/6).

Caractéristiques HPLC Colonnes et Eluants

Lichrospher 100 CH8/11 5 µm 25 cm Eluant MeOH/H₂O (75/25) 1ml/mn

Lichrospher RP18 5 µm 25 cm " MeOH/H₂O/Acide Ac (60/34/6)1ml/mn.

Les différents essais effectués sur les feuilles et les cellules d'*Abrus precatorius* ne nous ayant pas permis de mettre en évidence, par cette méthode, de la glycyrrhizine, nous avons pensé que la glycyrrhizine pourrait être "piégée", et nous avons essayé d'autres méthodes d'extraction :

MeOH pH 6,5 et 8,5 à froid, MeOH pH 6,5 et 8,5 à chaud, MeOH/H₂O (90/10, 70/30, 50/50), MeOH/H₂O/NH₄OH (90/8/2, 95/5/5, 80/10/10), MeOH/NH₄OH (98/2, 95/5, 90/10) et des temps de contact différents à chaud et à froid, MeOH/Ac. Acétique (90/8/2, 80/10/10, 65/29/6).

Nous avons également essayé le Butanol et l'Isopropanol avec des rapports solvant / eau différents, des purifications sur gel de silice, des préextractions à l'éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, toluène et dichlorométhane sans plus de succès.

Il est à noter que dans de nombreuses expériences les extractions faites dans les mêmes conditions sur les racines de *Glycyrrhiza glabra* nous ont toujours donné le pic de glycyrrhizine.

Il est également à noter qu'une incorporation de glycyrrhizinate d'ammonium du commerce dans un échantillon de feuille ou de cellules fait apparaître deux pics distincts (Fig. 1).

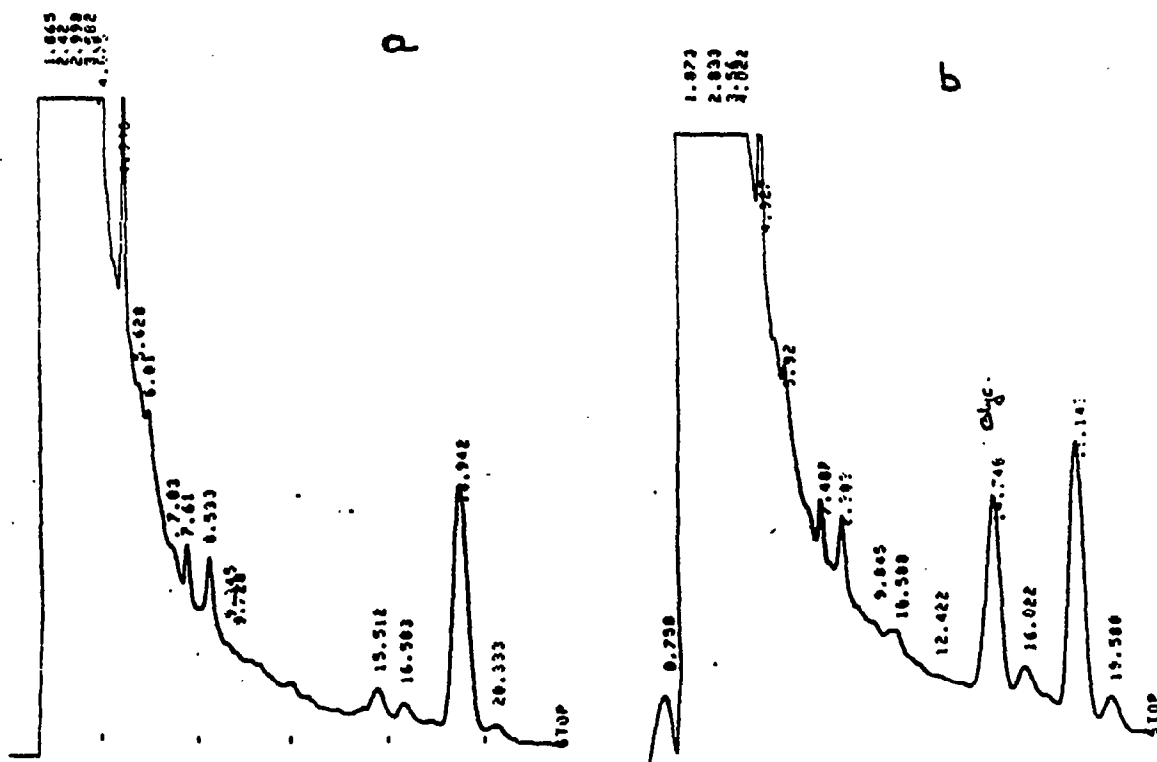


Fig.1. : a) Echantillon de feuille

b) Echantillon de feuille + Glycyrrhizine témoin

Nous avons donc envisagé de doser la glycyrrhizine sous forme d'acide β glycyrrhétinique après hydrolyse acide.

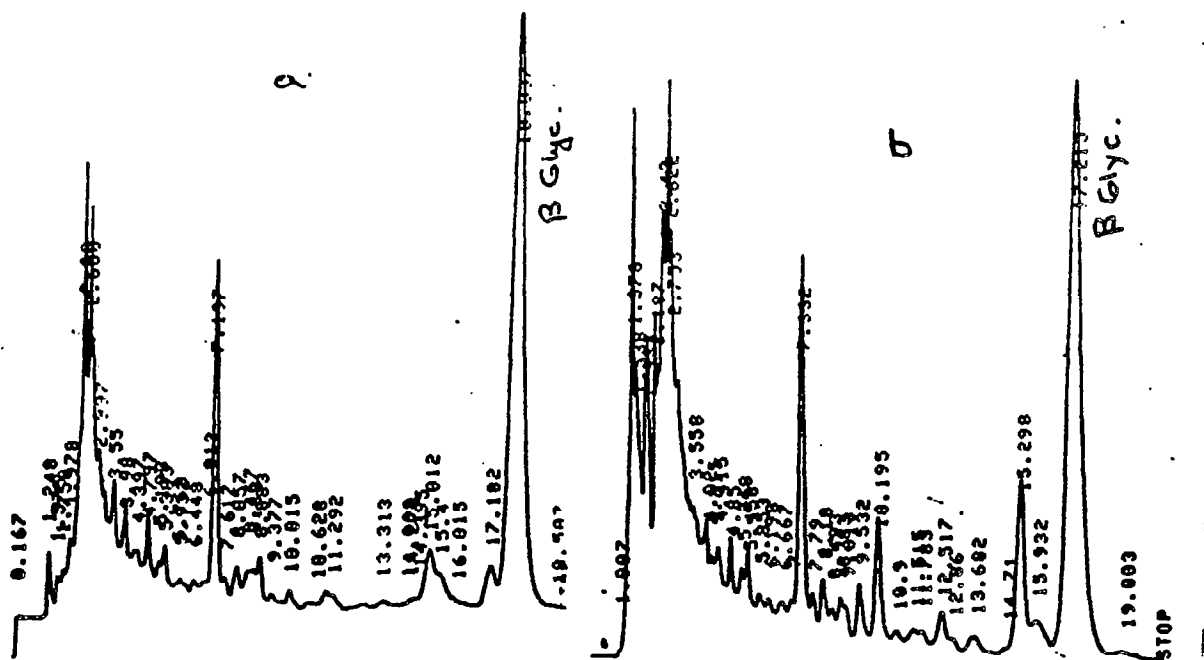
De nombreux auteurs ont travaillé sur l'extraction et le dosage de l'acide β glycyrrhétinique, la difficulté réside dans une hydrolyse contrôlée de la glycyrrhizine.

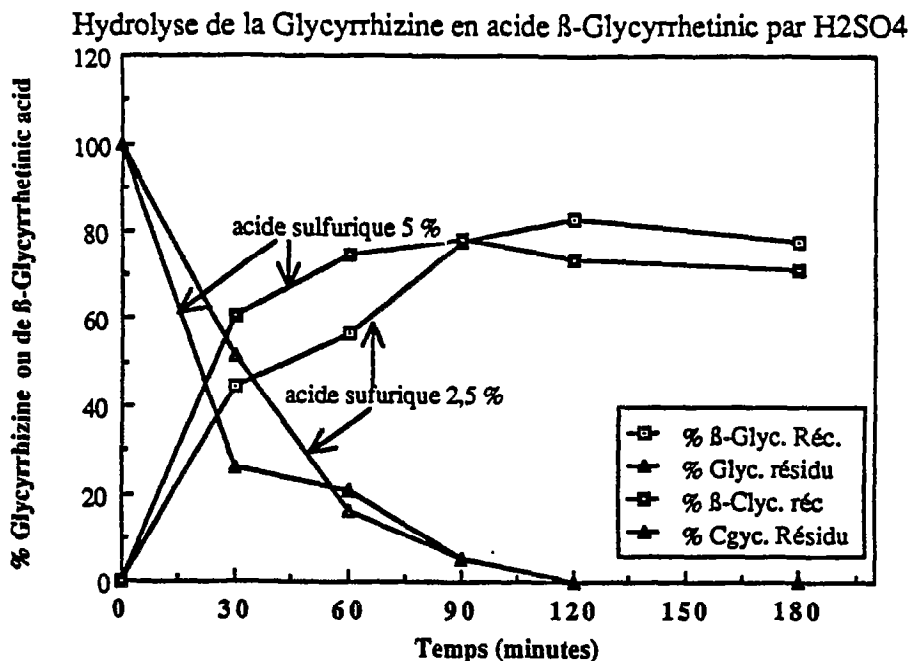
Parmi les différentes méthodes publiées, selon KILLACKY J. al. (7), l'utilisation du mélange dioxane/ H_2O (50/50) donne des résultats satisfaisants

1 g de feuilles ou de cellules sèches est finement broyé au mortier et mélangé à 30 ml du mélange dioxane/eau (50/50, v/v). Après 15 mn de chauffage à reflux sous réfrigérant, 20 ml d'Acide sulfurique à 5 % sont ajoutés et le mélange est échauffé de nouveau pendant 3 heures, toujours sous réfrigérant à reflux. Après arrêt du chauffage, et refroidissement du mélange, 20 ml de chloroforme sont ajoutés et le chauffage est poursuivi pendant 15 mn. Le mélange est filtré et le résidu est lavé avec 2 fois 20 ml de chloroforme. Le filtrat est placé dans une ampoule à décantation et la phase chloroformique est récupérée. La phase aqueuse est lavée encore deux fois avec 20 ml de chloroforme. Toutes les phases sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium anhydre.

La solution chloroformique est filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par du MeOH pur et injecté sur HPLC. Colonne Lichrospher 100 CH 8/11 5 μm 25 cm. Eluant MeOH/ H_2O (75/25) débit 1 ml/mn.

Pour tester nos conditions expérimentales, l'hydrolyse a été effectuée sur de la glycyrrhizine du commerce (Fig. 2 a et b).





Graphique : Glycyrrhizine récupérée en %
 β Glycyrrhétinique récupéré en % 2,5 % H_2SO_4
 Glycyrrhizine récupérée en %
 β Glycyrrhétinique récupéré en % 5 % H_2SO_4

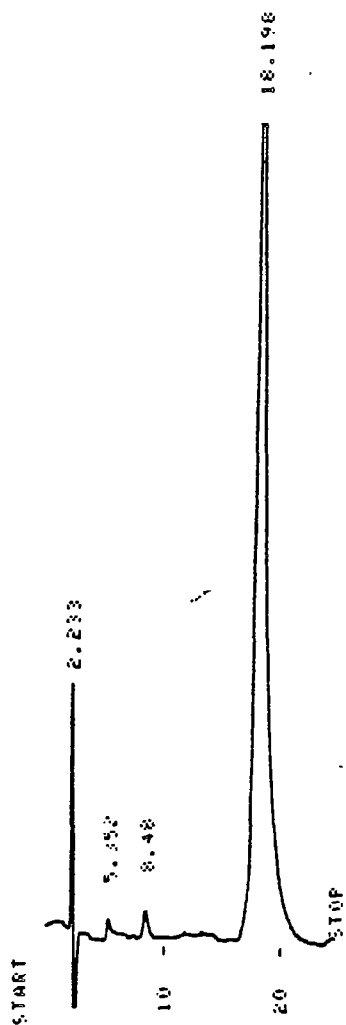
On peut considérer qu'après 2 heures l'hydrolyse est totale et que le pourcentage de récupération est de 80 %. Cette perte de 20 % est due certainement aux extractions et à une dégradation partielle de l'Acide β glycyrrhétinique libéré.

Des hydrolyses dans ces conditions ont été effectuées sur des extraits directs de feuilles et de cellules et nous n'avons jamais obtenu une quelconque trace d'Acide β glycyrrhétinique.

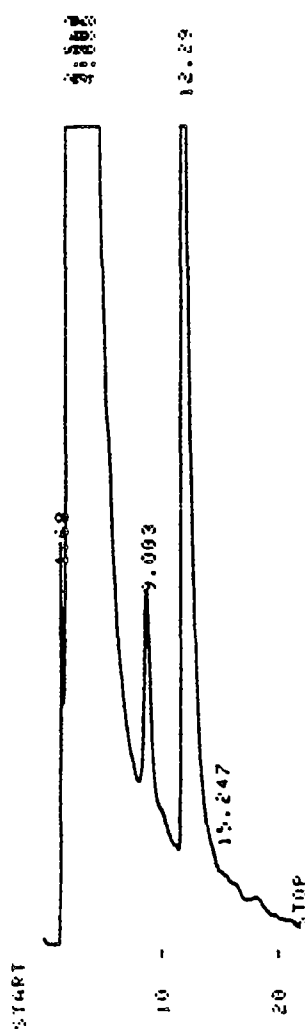
Des hydrolyses sur des culots obtenus après précipitation à l'éther n'ont également rien donné.

Une incorporation de glycyrrhizine exogène dans l'extrait végétal (issu de matériel végétal fraîchement récolté ou séché, ou culot de précipitation à l'éther), avant le début de l'hydrolyse, fait par contre apparaître un pic supplémentaire correspondant au pic témoin de l'acide β glycyrrhétinique (Fig. 3), démontrant ainsi, d'une part, que l'extrait végétal ne piège pas outre mesure ou ne dégrade pas l'acide β glycyrrhétinique, et, d'autre part, qu'il ne gêne en rien l'hydrolyse.

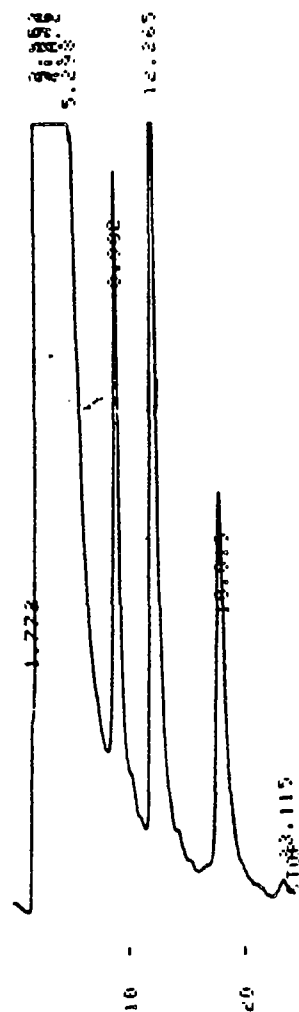
Devant l'insuccès de mise en évidence de glycyrrhizine et d'acide β glycyrrhétinique dans les feuilles et cellules d'*Abrus precatorius*, nous avons essayé de doser les triterpènes totaux en adaptant la méthode colorimétrique au bleu de méthylène de HABIB et al. (10) à notre matériel végétal.



Temoin
Acide β Glycyrrhétinique.



Extrait Fauille.



Extrait de Fauille
+ Glycyrrhizine
exogène

Mise au point du dosage de l'Acide β glycyrrhétinique par le bleu de méthylène.

Dans des tubes à essai, faire une gamme étalon de 0, 25, 50, 75, 100 μg d'Acide β glycyrrhétinique, compléter à 1 ml avec du chloroforme.

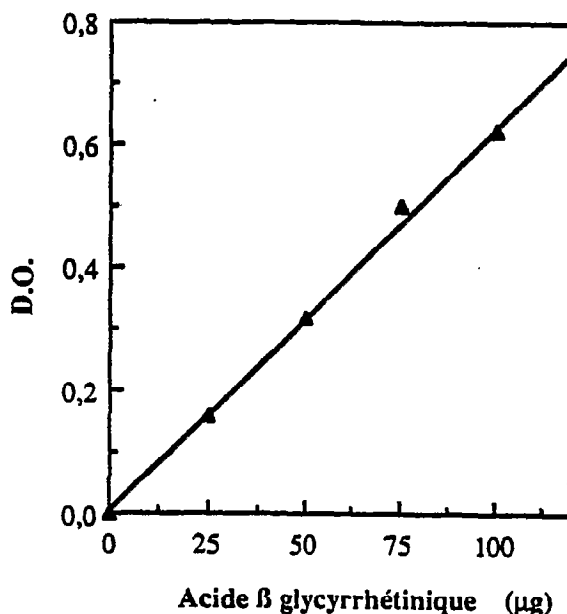
Ajouter 2 ml d'une solution tampon glycine 0,1 M pH 9,2 contenant 0,1 % de bleu de méthylène. Agiter fortement au Mixer-Vortex; laisser décanter. La phase chloroformique se colore en violet-bleu suivant la concentration. A l'aide d'une pipette pasteur munie d'une poire, aspirer la phase chloroformique inférieure.

Ajouter 1 ml de chloroforme dans le tube.

Agiter fortement 30 secondes au Mixer-Vortex.

Récupérer la phase chloroformique, répéter encore 1 fois l'extraction chloroformique.

Toutes les fractions chloroformiques sont rassemblées et complétées à un même volume de 5 ml avec du chloroforme. La coloration bleue est stabilisée par addition de 2 volumes d'éthanol pur. La coloration reste stable plusieurs heures. La lecture se fait à 640 nm.

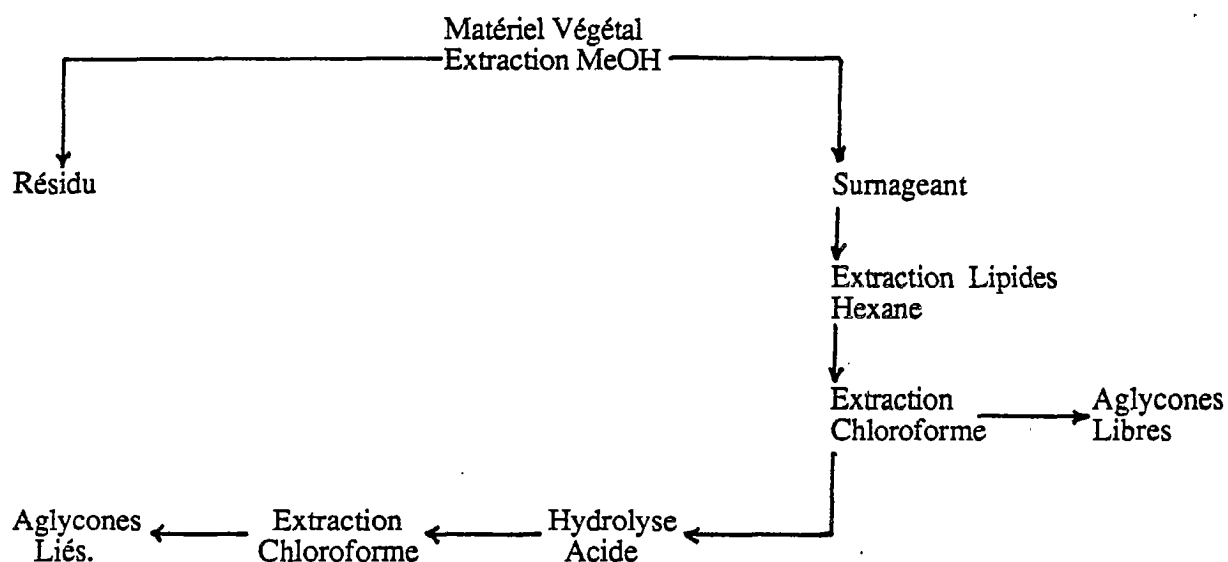


Courbe étalon de l'acide β Glycyrrhétinique dosé par la méthode au bleu de méthylène.

- Extraction des Triterpènes dans le matériel végétal

Les lipides interférant dans le dosage au bleu de méthylène, il était nécessaire de délipider nos échantillons.

Nous avons également essayé de faire la différence entre Aglycones libres et Aglycones liés aux sucres suivant le schéma :



Méthode

200 mg de matériel séché ou lyophilisé sont broyés au mortier avec 2 ml de MeOH.

Transvaser dans un tube Corex de 30 ml, contenant un petit barreau aimanté.

Porter à ébullition sous agitation magnétique pendant 1 mn dans un bain-marie à 70°C chauffé par un agitateur magnétique chauffant. Filtrer le surnageant sur un verre fritté n° 5.

Refaire trois fois l'extraction avec 5 ml de MeOH/H₂O (70/30).

Sur les extraits méthanoliques, dans un tube Corex de 30 ml, faire une extraction avec 5 ml d'Hexane. Laisser décantier (ou centrifuger) puis refaire trois extractions successives avec 3 ml d'Hexane.

Toutes les fractions Hexane sont rassemblées et complétées à 15 ml. Fraction Hexane (lipides).

La phase méthanolique restante est évaporée sous vide pour chasser le méthanol.

Le résidu aqueux est transvasé quantitativement dans un tube Corex et complété à 10 ml avec de l'eau. Extraire avec 5 ml de chloroforme en agitant fortement, laisser décantier ou centrifuger, prélever la phase chloroformique à l'aide d'une pipette pasteur munie d'une poire. Recommencer l'extraction chloroformique avec 2 fois 2,5 ml de chloroforme.

Rassembler les extraits chloroformiques et compléter à 10 ml avec du chloroforme. Fraction Aglycones libres.

L'extrait aqueux restant est transvasé quantitativement dans un tube pour hydrolyse. Ajouter la quantité de dioxane, H₂SO₄ et H₂O pour avoir en final : dioxane 25 %, H₂SO₄ 2,5 %.

Chauffer au bain de glycérine à 100°C pendant 2 h. Après refroidissement, extraire par 3 fois 3 ml de chloroforme.

Compléter à 10 ml - Fraction Aglycones liés

Nous avons soumis aux mêmes opérations une quantité connue d'Acide β glycyrrhétinique afin de déterminer le rendement de l'extraction.

Phase Hexane	=	5,6 %
Phase Aglycones libre	=	92,1 %
Phase Aglycones liés	=	2,2 %

Résultats : Les résultats du tableau 2 représentent la moyenne de 2 répétitions pour 6 échantillons d'une même souche et d'un même temps de culture et de 2 répétitions pour 4 échantillons d'une même plante.

Les résultats sont exprimés, par rapport à une gamme étalon d'ac.β glycyrrhétinique, en mg pour 100 mg poids sec d'échantillon.

Cellules	Fraction Hexane µg	Fraction libre µg	Fraction Liée µg	Fraction Libre+Liée µg	% Libre/Total
C1	361,0	124,5	180,7	305,2	40,8
C2	353,2	113,8	159,6	273,4	41,6
C3	423,9	888,5	207,4	295,9	29,9
C4	362,5	121,7	210,0	321,7	37,8
C5	389,9	94,4	163,1	259,5	37,1
C6	328,5	96,4	160,3	256,7	37,5
Moyenne	369,8	106,9	180,2	285,4	37,5
Feuille					
F1	948,1	279	6.680,4	6.959,4	4
F2	883,7	302	6.985,0	7.287,0	4,1
F3	1016,8	352	4.120,0	4.472,0	7,9
F4	867	394,8	3.888,0	4.282,8	9,2
Moyenne	928,9	331,9	5.418,0	5.749,9	5,8

Dans ce tableau, il est à noter que les aglycones libres représentent environ 37,5 % du total dans le cas des cellules, alors qu'ils ne représentent qu'environ 6 % dans les feuilles.

Il est également à noter que, dans les feuilles, les aglycones liés sont 30 fois plus importants que dans les cellules.

Il faut également remarquer une assez grande disparité des résultats, surtout sur les échantillons de feuilles.

De nombreux essais ont été effectués comparativement sur des cultures de cellules à un stade différent, sur des cals verts ou hétérotrophes. Aucun résultat significatif n'a pu être mis en évidence.

La disparité des résultats obtenus par cette méthode en est certainement la cause, d'autant qu'un rajout de glycyrrhizine ou d'acide β glycyrrhétinique exogène ne nous permettait pas de les retrouver dans les résultats.

Nous avons également constaté que, globalement, *Abrus precatorius* ne contenait pas plus de triterpènes mesurables par cette méthode, dans ses suspensions cellulaires ou dans ses feuilles, que tout autre plante, en l'occurrence *Tephrosia vogelii* cultivée *in vitro* au laboratoire.

CONCLUSION:

Malgré les nombreuses assertions trouvées dans la littérature concernant la présence de fortes teneurs en glycyrrhizine dans les feuilles d'*Abrus precatorius* (5 à 10 % / MS), nos recherches ne nous ont pas permis de mettre en évidence la moindre trace de glycyrrhizine ni de son aglycone, l'acide β glycyrrhétinique, ni dans les feuilles, ni dans le matériel d'*Abrus precatorius* cultivé *in vitro*, que ce soit sur du matériel frais, séché ou lyophilisé. Ces résultats sont en accord avec la seule publication mettant en doute les précédentes assertions (11). De même, selon la méthode de dosage des triterpènes totaux utilisant la coloration au bleu de méthylène (dont la réelle spécificité reste encore à démontrer), le matériel végétal issu d'*Abrus* ne semble pas présenter de plus fortes teneurs en triterpènes que n'importe quelle autre plante connue pour ne pas être particulièrement riche en terpènes. Il nous a donc été impossible de relier les évolutions des paramètres biochimiques et physiologiques du matériel issu d'*Abrus precatorius* cultivé *in vitro*, à des paramètres de production de métabolites secondaires potentiellement utiles (triterpènes).

Bibliographie

- 1- MILLET, Y., FERRON, F. et COSTES, C., 1978, Quelques résultats sur la Physiologie d'*Abrus precatorius* L., *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, Tome XII, n°2, p. 151-156
- 2- BOUQUET, A. et DEBRAY, M., 1974, *Plantes Médicinales de Côte d'Ivoire, Travaux et Documents de l'ORSTOM*, N°32, p.137.
- 3- KERHARO, J. et ADAM J.G., 1974, *La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle*. Ed. Vigot Frères pp. 435-441.
- 4- MERCK & CO., INC, 1976; *Abrus*. THE MERCK INDEX (9th Edition), Martha Windholz Ed., p. 1-2.
- 5- TEH-CHANG CHIANG, HSON-MOU CHANG et T.C.W. MAK, 1983, New olean-type Triterpenes from *Abrus precatorius* and X-Ray Crystal Structure of Abrusgenic acid-Methanol 1:1 Solvate. *Planta Medica*, Vol. 49, pp. 165-169.
- 6- Von O. STICHER und F. SOLDATI, 1978, Glycirrhizinsäurebestimmung in *Radix Liquiritiae* mit HPLC. *Pharm. ActaHelv.*, 53, Nr 2
- 7- KILLACKY, J., M.S. ROSS and T.D. TURNER, 1976 - The determination of β -Glycyrrhetic Acid in Liquorice by High Performance Liquid Chromatography. *Planta medica*, Vol. 30, pp. 310-316.
- 8- WAGNER, H., BLADT, S. and E.M. ZGAINSKI; 1984 - Saponine Drugs (*Liquiritiae radix*) in : *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg NewYork Tokyo, pp.225-241.
- 9- WORA, P.S.; 1982 - HPLC Determination of Glycyrrhizic Acid or Glycyrrhizic Acid Salts in Various Licorice Products : Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 65, N°3, pp. 572-574.
- 10- HABIB, A.M., EL-SEBAKHY, N.A. and H.A. KADRY; 1979 - New and Simple Methylene Blue Colorimetric Assay for Glycyrrhizin in Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; vol. 68, N° 10, pp. 1221-1223
- 11- SHAH, C.S. and J.G. BHATT, 1973. - *Abrus precatorius* as a Substitute for Liquorice. *The Indian Journal of Pharmacy*, vol. 35, N°3, 102-104.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

PLANCHE 1 : *Abrus precatorius* - Présentation générale et mise en culture *in vitro*

- 1 - graines d'*Abrus precatorius*
- 2 - fleur d'*Abrus precatorius*
- 3 - germination stérile
- 4 - microbouture enracinée

PLANCHE 2 : *Abrus precatorius* - Techniques de culture *in vitro*

- 1 - suspensions photomixotrophes en incubateur
- 2 - cals de proliférations hétéro & photomixotrophes
- 3 - bioréacteur et système de contrôle
- 4 - cuve de bioréacteur avec sondes

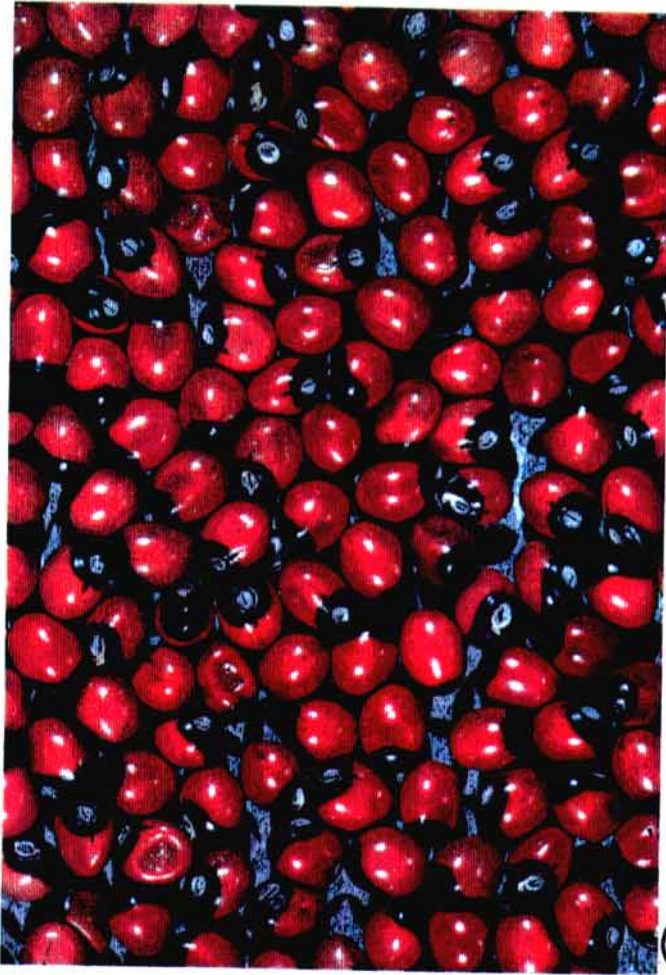
PLANCHE 3 : Observations en microscopie électronique et photonique

- 1 - cellule photomixotrophe (cals) (x 2700)
- 2 - cellule hétérotrophe (x 2700)
- 3 - suspension cellulaire photomixotrophe en contraste de phase
- 4 - suspension cellulaire photomixotrophe (début de culture)

PLANCHE 4 : Evolution de l'ultrastructure chloroplastique au cours du verdissement

- 1 - amyloplaste (x 20 000)
(a: grain d'amidon - am: amyloplaste - mit: mitochondrie)
- 2 - chloroplaste en cours de différenciation (x 20 000)
(th: thylakoïdes en cours de différenciation)
- 3 - chloroplaste parfaitement différencié (x 20 000)
(th: thylakoïdes - l: inclusion lipidique)

Abrus precatorius
Présentation générale
et mise en culture in vitro



①

②

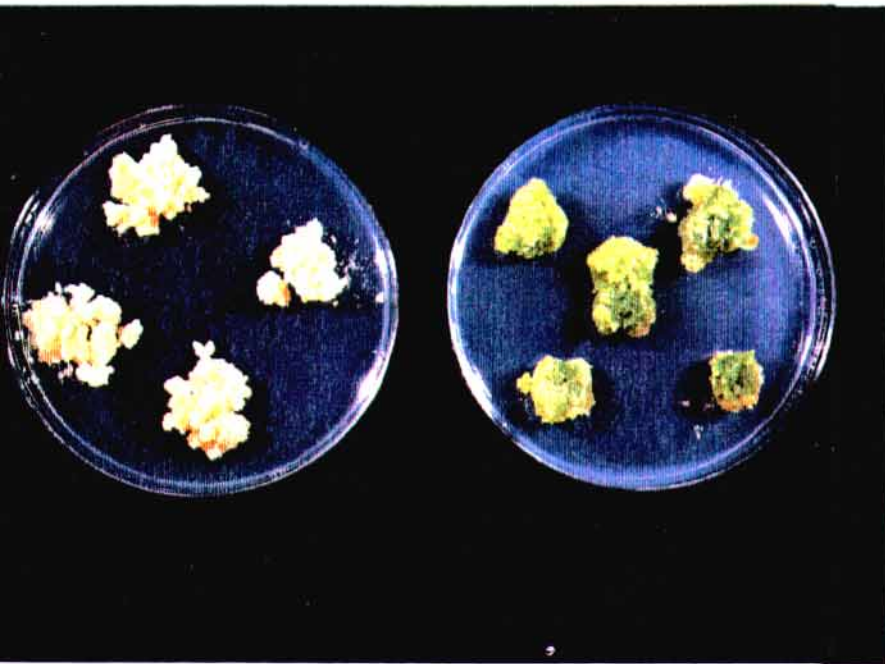


③

④



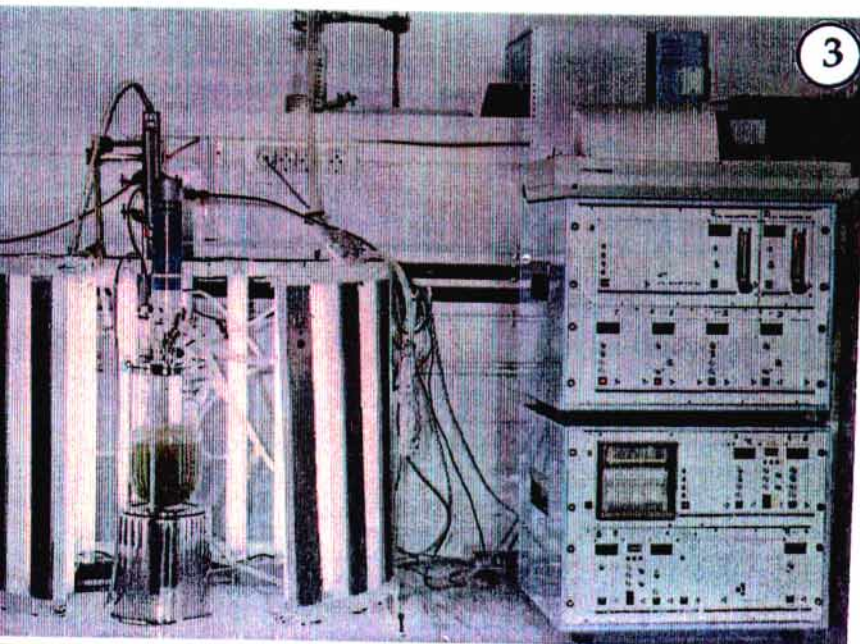
PLANCHE n°2

*Abrus precatorius*Techniques de culture in vitro

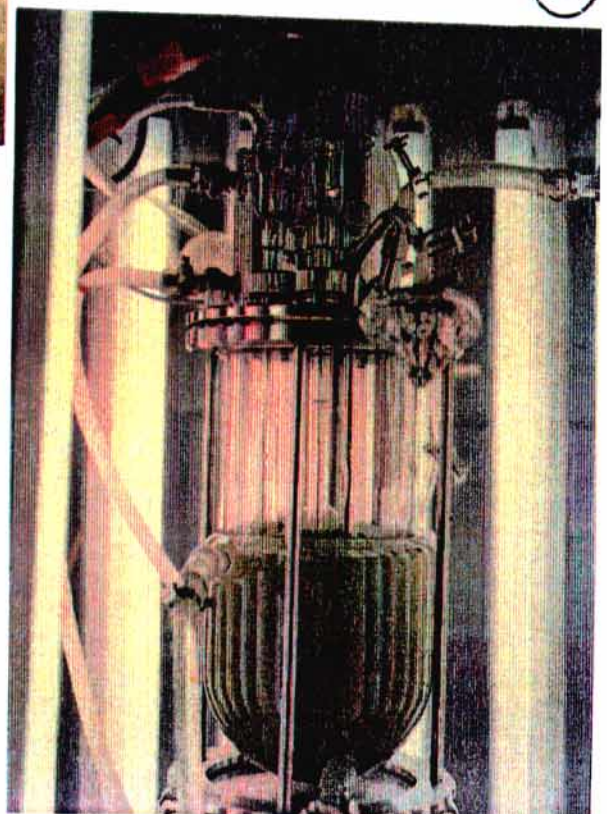
①



②



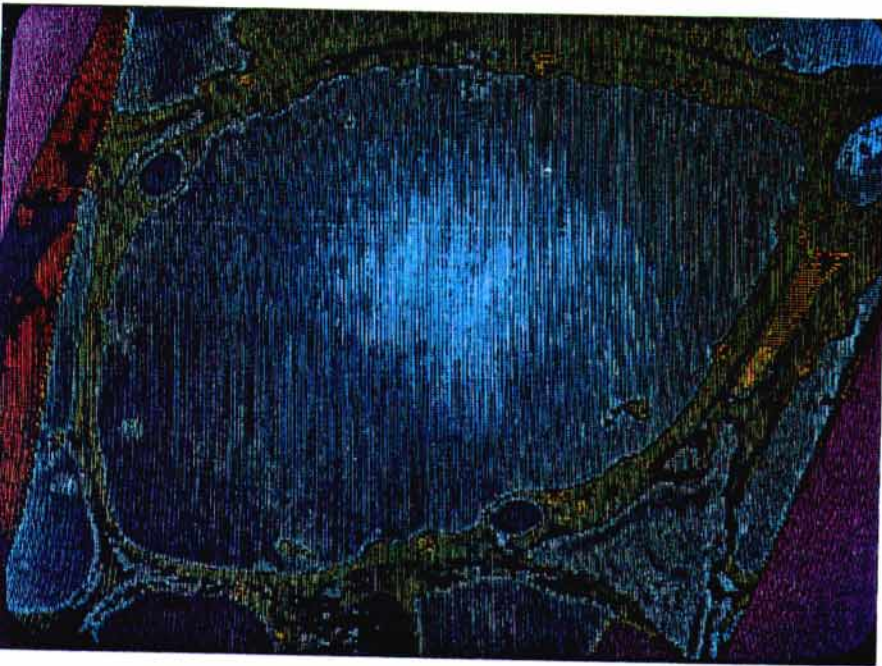
③



④



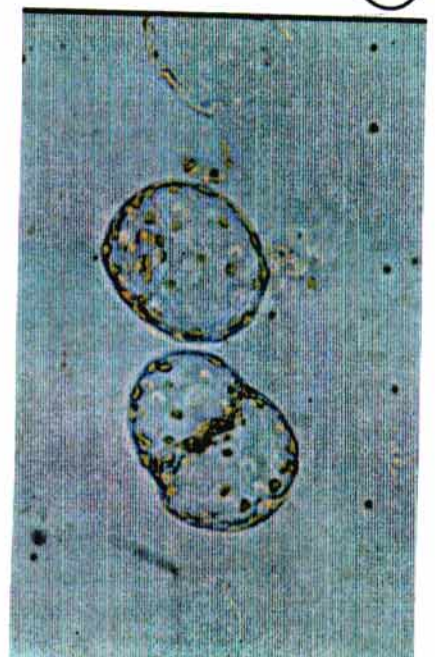
①



②



③



④

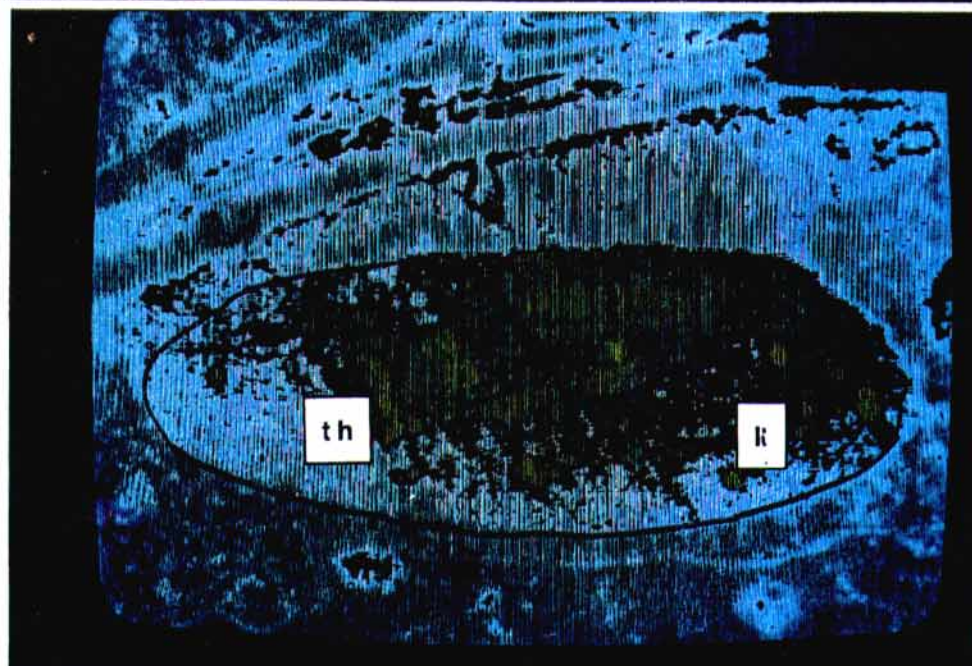
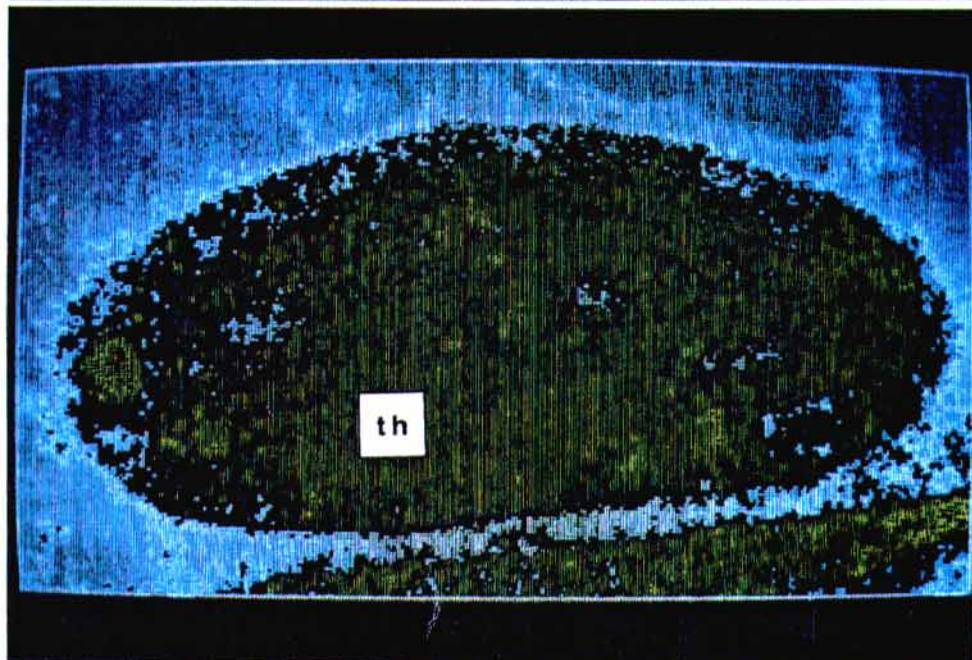
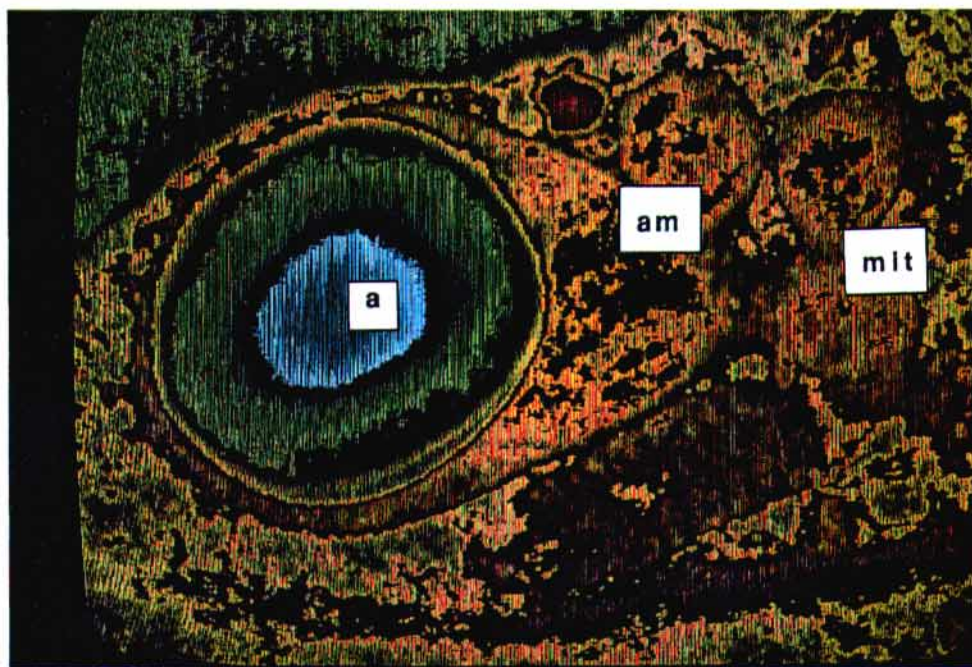


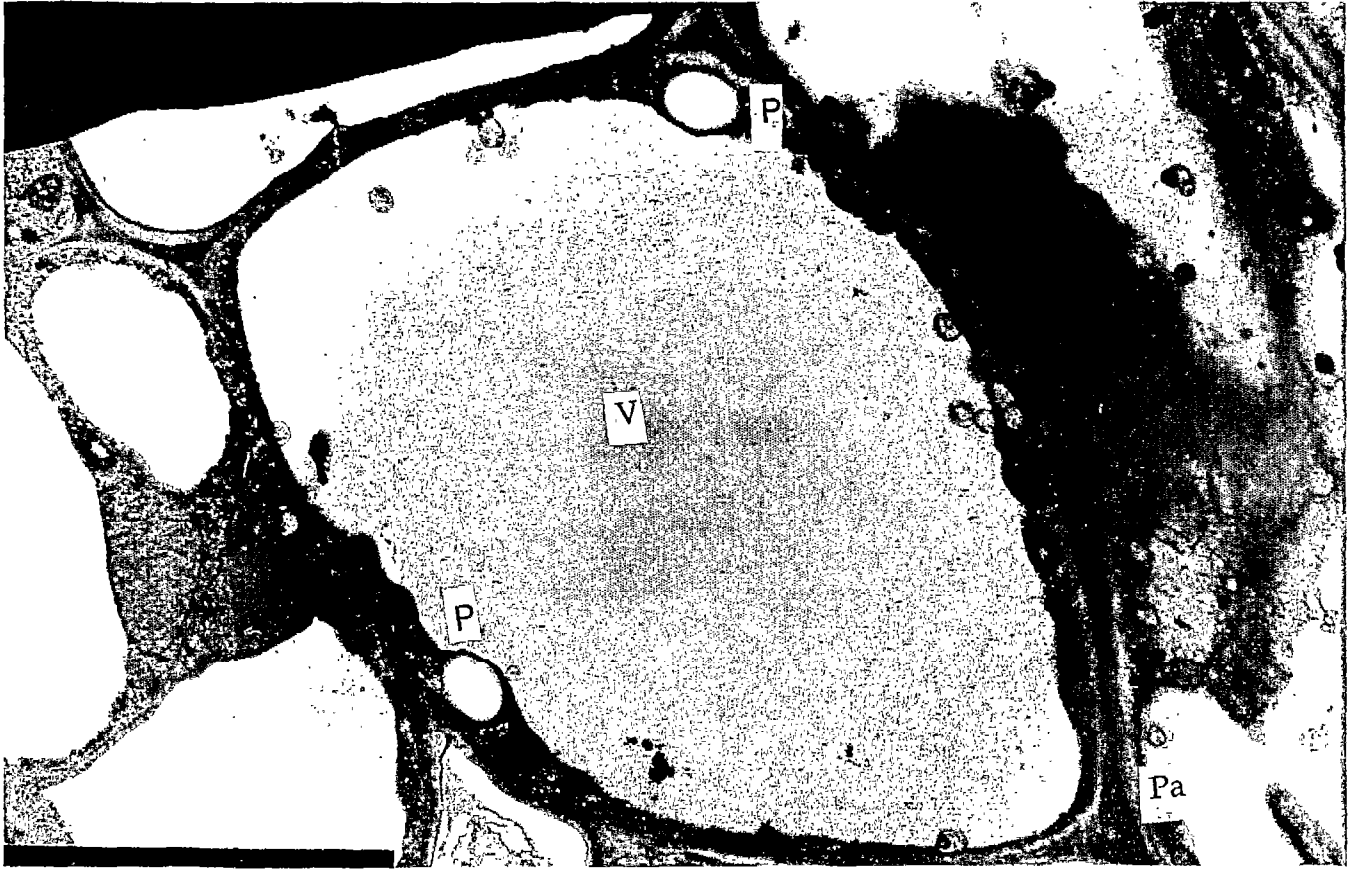
PLANCHE n°4

EVOLUTION DE
 L'ULTRASTRUCTURE
 CHLOROPLASTIQUE
 AU COURS DU
 VERDISSEMENT

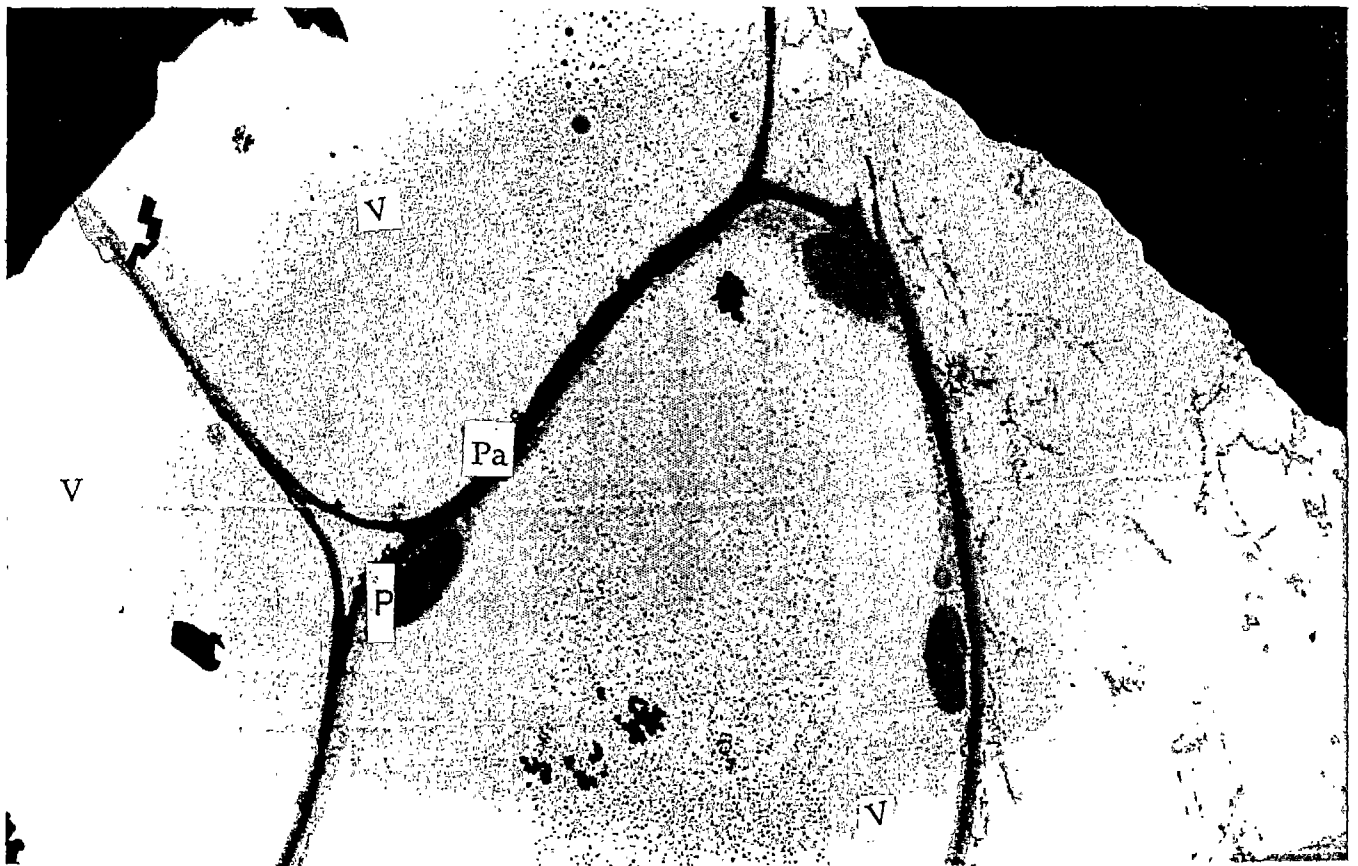
LEGENDES DES PHOTOGRAPHIES NOIR & BLANC: (Planches 5,6, et 7)

a	amidon
cy	cytoplasme
li	inclusions lipidiques
Mi	mitochondrie
N	noyau
nu	nucleole
P	Plaste
Pa	Paroi
thy	thylakoides
re	Reticulum endoplasmique
V	vacuole

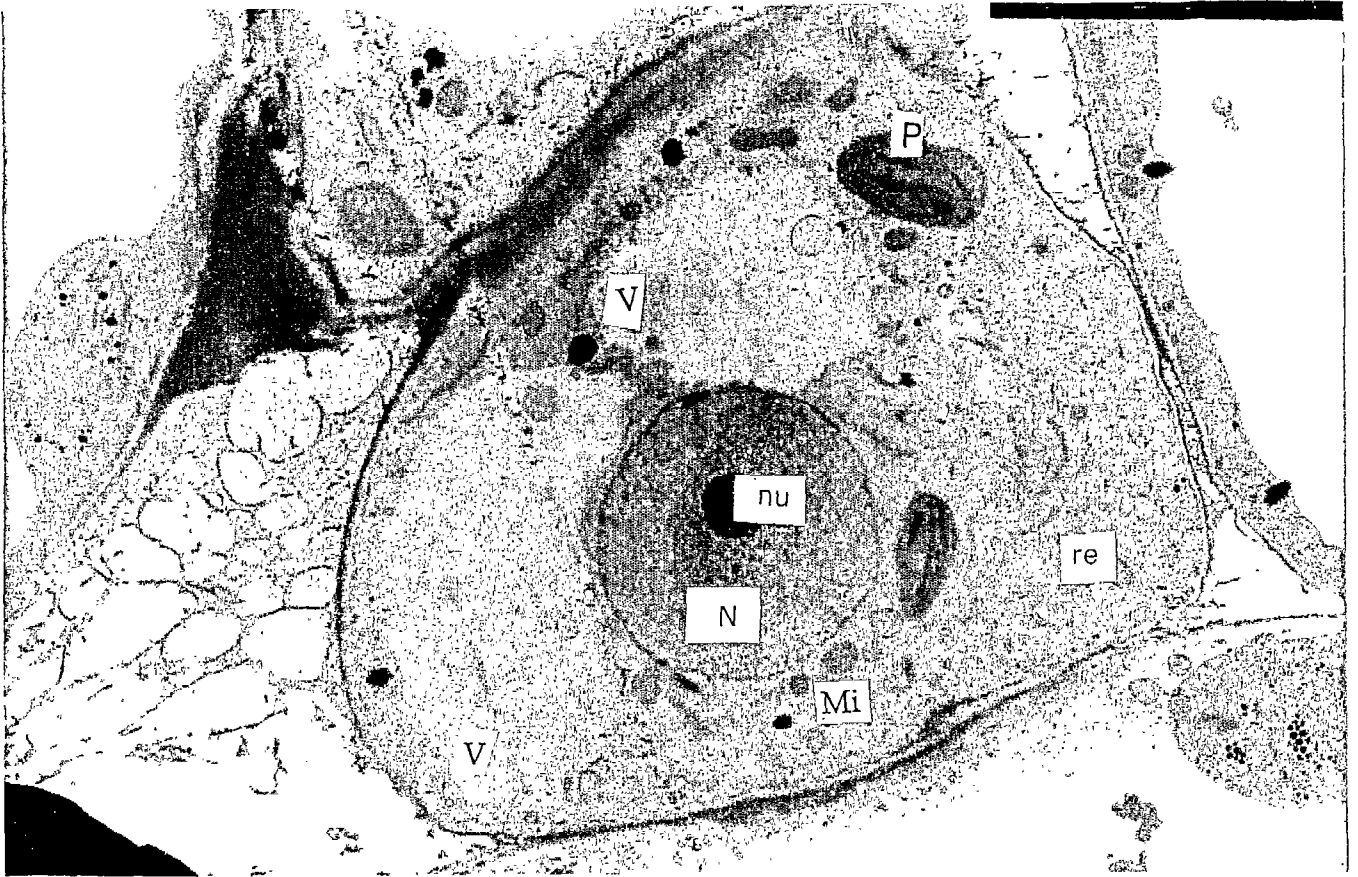
PLANCHE n°5



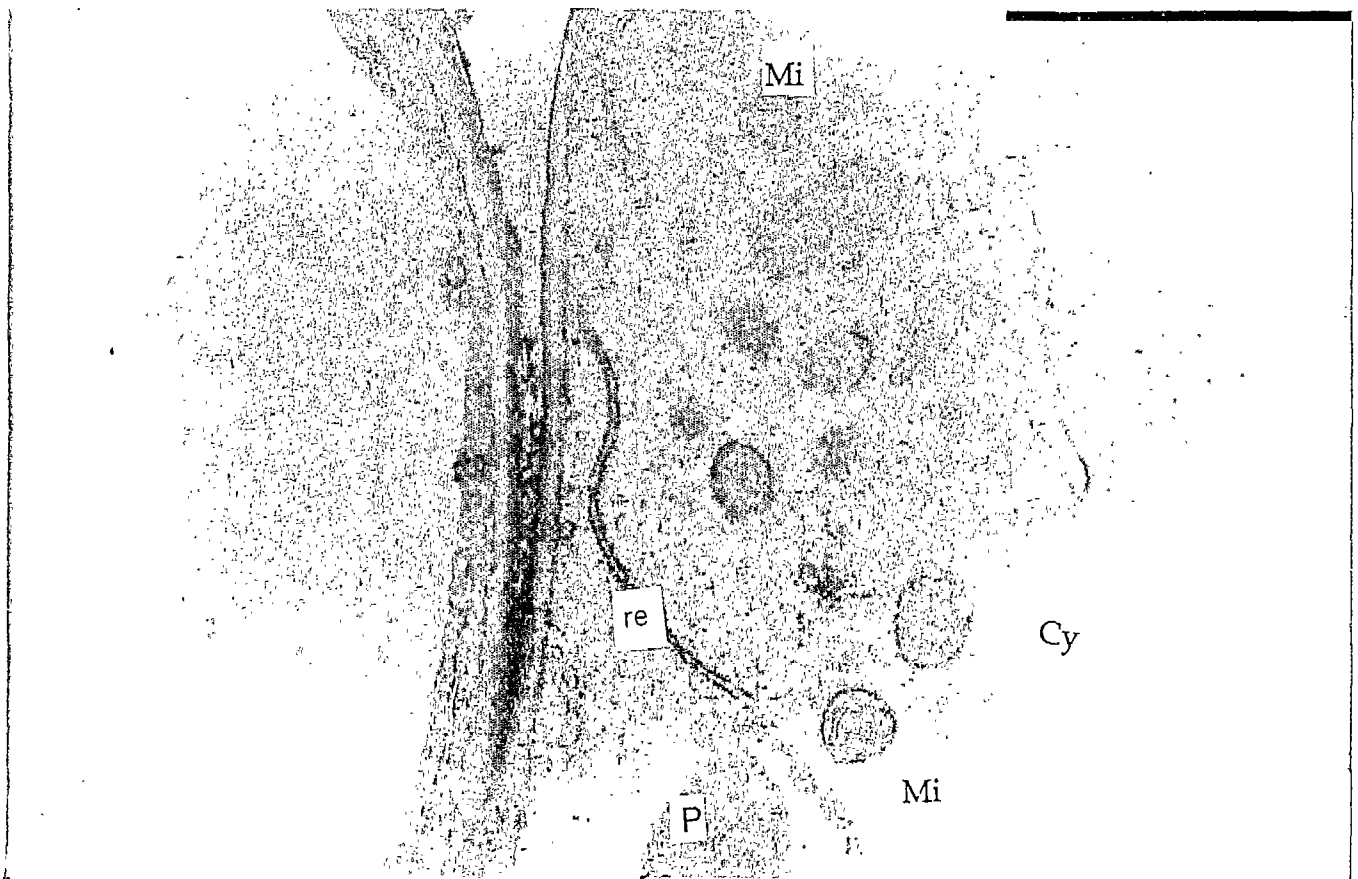
A) Cellule hétérotrophe mature (cal) G x 2 700



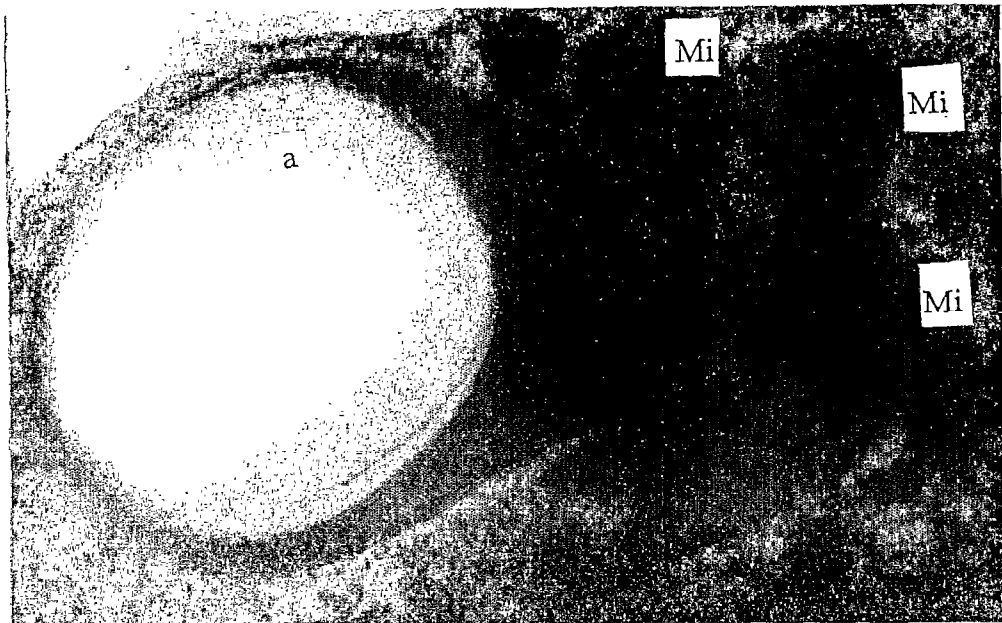
B) Cellule en cours de verdissement, mature (cal) G x 2 700



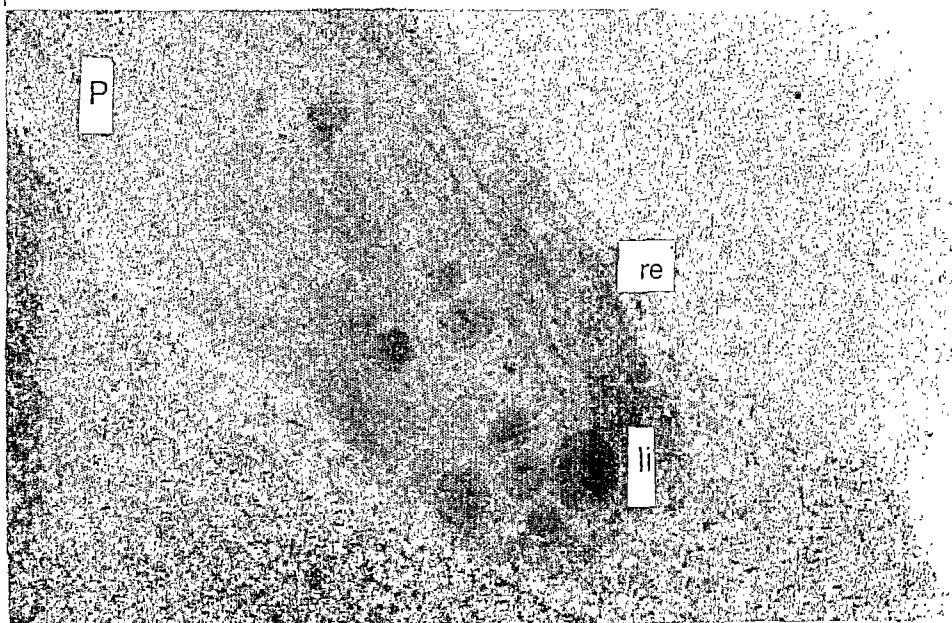
A) Jeune cellule de cal photomixotrophe G x 2 700



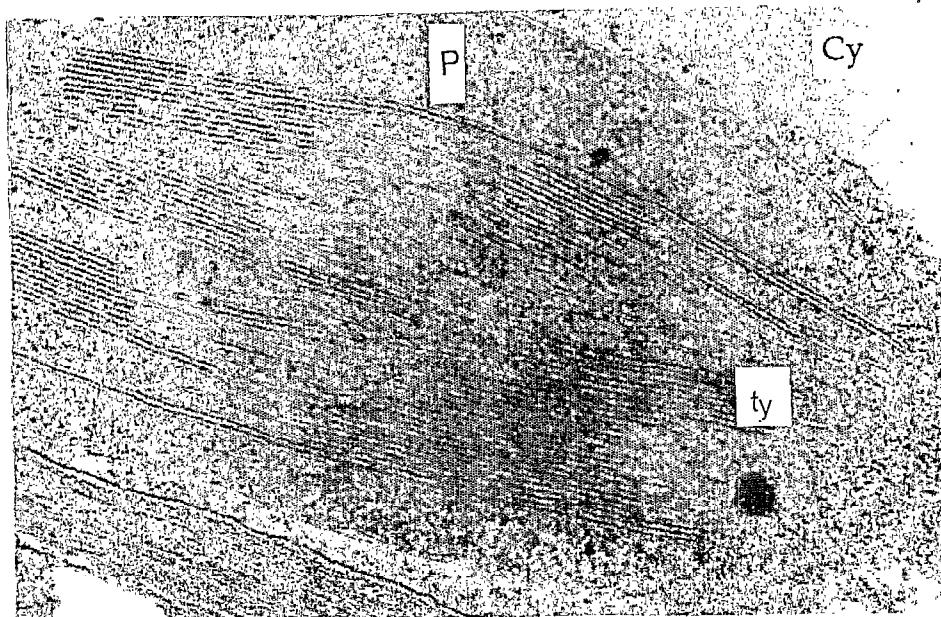
B) Détail du reticulum endoplasmique G x 20 000 (Cellule de cal photomixotrophe)



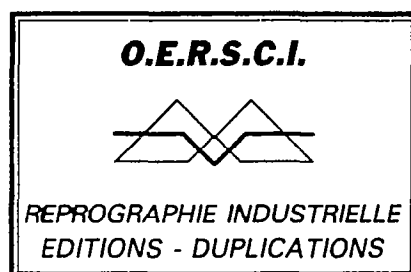
A) Amyloplastes (dans un cal hétérotrophe) G x 20 000



B) Chloroplaste en cours de différenciation G x 20 000



*Office d'Édition de la Recherche Scientifique
et Coopération Internationale*



*Parc Modulopolis H 1 Zone Euromédecine
Montpellier 67.52.20.05*

RESUME

Dans le but de cerner in vitro l'impact de la photosynthèse sur les voies métaboliques essentielles, un souchier de lignées cellulaires photomixotrophes et photohétérotrophes a été établi, sous forme de cals et de suspensions cellulaires, pour une plante médicinale tropicale: *Abrus precatorius* L.(Leguminosae).

La consommation, en cours de culture, des macroéléments majeurs du milieu (nitrates, ammonium, phosphore inorganique, sulfates) a été mesurée. Cette étude a permis de mettre en évidence des différences importantes entre les besoins nutritionnels pour chaque élément.

De plus, une caractérisation partielle des deux enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote minéral: Nitrate Réductase (NR) et Glutamine Synthétase (GS) a été réalisée.

Afin de mieux connaître les phénomènes biochimiques liés à la photomixotrophie, l'activité de deux carboxylases (Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase -*Rubisco*- & PhosphoEnol Pyruvate Carboxylase -*PEPc*-) a été mesurée sur les suspensions cellulaires.

Nous avons suivi l'activité de ces quatre systèmes enzymatiques (NR,GS *Rubisco* & *PEPc*) au cours de cultures conduites dans différentes conditions (hétéro/mixotrophie) à l'aide de deux systèmes de culture (fioles d'Erlenmeyer et bioréacteur expérimental de 2 litres).

Cette étude est complétée par une caractérisation immunologique de ces enzymes, permettant de dégager quelques données concernant leur biosynthèse et leur régulation.

Mots-clés:

Abrus precatorius L.
Cultures cellulaires
Photomixotrophie
Nutrition azotée
Nitrate Réductase
Glutamine Synthétase
Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase
PhosphoEnolPyruvate Carboxylase